Generalità sui protisti

I protisti sono microorganismi unicellulari eucariotici.

Volvox= alga unicellulare che si riunisce in colonie, tenute insieme da una guaina gelatinosa.

Sono un gruppo eterogeneo di circa 50mila specie diverse e il gruppo si divide in 3 sottogruppi: alghe unicellulari fotosintetiche (alghe verdi,brune, rosse…), i funghi unicellulari/funghi inferiori (mixomiceti, oomiceti/ muffe d'acqua, microsporidi; eterotrofi), protozoi (cigliati e flagellati, eterotrofi)

Vivono in qualsiasi ambiente in cui è presente acqua allo stato liquido (acque dolci, salate, salmastre, liquidi di altri organismi[simbionti], terreno umido, acque del sottosuolo), in alternativa possono solo sopravvivere.

Alcune specie conducono vita libera, altre endosimbionte es. Euplotes woodruffi che è ospite di un fungo unicellulare microsporidio, euplotes spora binucleata.

Come fare un campionamento di protisti: barattolino per urinocoltura, prendere un campione sul fondo di un ruscello con una porzione di substrato (¼ substrato, 2/4 acqua, ¼ libero), poi in capsula petri si cercano protisti, poi se ne isola uno con una pipetta di pasteur e lo si isola mettendolo in condizione di riprodursi (così per ogni cellula); poi si fa estrazione del DNA, PCR con marcatore specifico per identificare la specie.

Collezioni ufficiali: istituzioni che raccolgono i ceppi presenti in natura e li mantengono per venderla ai laboratori

La locomozioni

Alcuni protisti sono solo immobili, altri si muovono in 3 modi:

- Ameboide, attraverso la formazione di estensioni **temporanee** del citoplasma (pseudopodi o falsi piedi); es. sarcodini;
- Tramite battito ciliare, strutture filiformi **permanenti** es. protozoi ciliati;
- Mediante battito flagellare, struttura filiforme più lunga delle ciglia e anc'esse permanenti, es. protozoi flagellati, mastigofori, alghe unicellulari;

Si ipotizza che l'endoflagello dei protozoi sia derivato dallo spirochete

Metabolismo

Autotrofi (alghe unicellulari)

Possono essere eterotrofi per assorbimento, funghi unicellulari, o per ingestione, protozoi ciliati e flagellati.

Mixotrofi, che scelgono il tipo di nutrizione passando dalla condizione autotrofa a quella eterotrofa, a seconda della situazione ambientale es. euglena, clamidomonas

Riproduzione

La maggior parte si riproduce per via asessuata, per scissione binaria, multipla, schizogonia, gemmazione o sporulazione

In altri gruppi è sessuata, in altri ancora si hanno entrambe

Opaline

protozoi ciliati di grosse dimensioni, forma appiattita, con cilia vibratili; sono eterotrofi, che sono commensali o parassiti di organismi superiori, soprattutto vertebrati

Ciglia organizzate in lunghe fila circolari, con la membrana esterna che forma pliche membranose tra una fila e l'altra di ciglia. Si ritiene che sia a livello di queste pliche che avvenga l'assorbimento di cibo

Sono multimicronucleate

Volvox

Unicellulari, biflagellate, colonie hanno avuto un ruolo importante nell'evoluzione: si ritengono gli organismi che hanno determinato il passaggio dall'unicellularità alla pluricellularità.

Le cellule delle colonie non sono ne tutte identiche ne del tutto indipendenti; le cellule sulla superficie esterna hanno più funzioni vegetative (predazione, difesa, fotosintesi) e quelle interne hanno funzioni riproduttive. Si possono osservare connessioni tra citoplasmi di cellule adiacenti

Radiolari

Protozoi marini caratterizzati dalla presenza di un guscio e i gusci hanno fori che permettono la fouriuscita di filamenti citoplasmatici che i radiolari usano per catturare le prede. Il numero e la disposizione dei fori hanno utilità per identificare le specie. Il guscio è di natura silicia e può contenere tracce di vari metalli. Quando completano il loro ciclo vitale i gusci si depositano sui fondali oceanici, permettendo la formazione di alcune rocce sedimentarie.

Foraminiferi

Sono dei protozoi marini, caratterizzati da gusci con varie forme, generalmente a spirale; il guscio può essere monotalamico o pluritalamico (anche con concamerazioni multiple). Anche il guscio dei foraminferi può avere dei fori, da cui escono formazioni filamentose di citoplasma, gli pseudopodi, usati per muoversi. Il guscio è di natura calcarea (carbonato di calcio).

Stentor

È un protozoo ciliato con forma ad imbuto, vive nelle acque dolci e si muove con il battito delle ciglia, che si trovano sul bordo della porzione più larga della cellula. Le ciglia svolgono un ruolo anche nella nutrizione, perché creano una corrente ciliare che viene convogliata al centro della porzione più larga della cellula, al citostoma (porzione buccale). Può anche fissarsi ad un substrato, formato da frammenti di foglie/materiale organico, tramite corti pseudopodi temporanei nella porzione posteriore che presentano a loro volta ghiandole adesive, che rilasciano sostanze mucillaginose/ adesive per legarsi al substrato.

Presenta un macronucleo avvolto a spirale e a forma di collana di perle

Criptomonas

Criptomonadini, gruppo di alghe unicellulari flagellate fotosintetiche, con 2 flagelli, che partomo dal vestibolo, vivono nelle acque dolci; nella membrana che circonda il vestibolo sporgono dei minuscoli organuli, gli eiectosomi, degli organuli in grado di lanciare sostanze tossiche contro eventuali aggressori.

4,5-5 mld di anni fa si è avuta l'origine, 4 mld di anni fa la comparsa della vita; i progenitori di tutti gli organismi viventi si sono poi evoluti in maniera differente e in tempi differenti in archeobatteri, procarioti e eucarioti. Quella degli eucarioti, secondo la teoria endosimbiotica di Linn Margulis.

I protisti sono simili alle prime cellule eucariote nate dall'endosimbiosi. I protisti hanno determinato la conquista da parte della cellula dell'evolluzione eucariotica. Spesso i protisti sono definiti come i principali artefici dei due più grandi salti evolutivi: la conquista dell'organizzazione cellulare eucariotica e il passaggio alla pluricellularità.

Pur essendo eucariotica la cellula dei protisti è più complessa di quella di altri eucarioti perché svolge tutte le funzioni (es. vescicola di Muller, sensore di gravità in Loxodes striatus), Occhio connesso a un tentacolo retrattile e propulsore in Eryhropsis pavillardi)

I protisti devono anche essere in grado di affrontare con successo le sfide quotidiane: ricerca di cibo, partner, condizioni ambientali favorevoli, fuga dai predatori, diffusione nell'ambiente…

LE ALGHE

Organismi autotrofi, eucariotici, fotosintetici che vivono in ambiente umido, un po' dovunque.

L'organizzazione cellulare pluricellulare non appartiene ai protisti ma agli organismi superiori.

L'organizzazione unicellulare è rappresentata da organismi a vita libera, che si possono muovere mediante con flagelli o pseudpodi (movimento ameboide). L'organizzazione coloniale è rappresentata da più individui coloniali che si mettono insieme in oorganizzazioni di cellule, come Volvox. Le cellule della colonia possono essere mantenute insieme da una guaina mucillaginosa/gelatinosa. L'organizzazione cenocitica o sifonale è caratterizzata dalla presenza di singole cellule con numerosi nuclei derivati da ripetute e successive divisioni mitotiche, che non sono però seguite da citocinesi.

Nell'organizzazione pluricellulare si osserva la secializzazione dell'individuo.

I cicli vitali delle alghe sono essenzialmente 3: diplonte, aplonte o aplodiplonte. Si riferiscono alla fase cellulare predominante nel ciclo (aploide, diploide, entrambe). Si chiamano anche zigotico, gametico o sporico, che rappresentano la fase minoritaria.

Nelle alghe ritroviamo 4 tipi di gamia: **isogamia**, con gameti complementari morfologicamente simili, derivanti da individui diversi; **anisogamia**, con gameti complementari morfologicamente simili, fisiologicamente diversi (possono derivare anche dallo stesso individuo); **eterogamia**, con gameti complementari morfologicamente diversi (genr. per dimensioni, più piccolo quello maschile più grande quello femminile); oogamia, con gameti complementari morfologicamente diversi per dimensioni come nell'eterogamia, ma la specializzazione prevede che il gamete maschile sia anche mobile, simile agli spermatozoi, entre quello grande/femminile è immobile.

La classificazione delle alghe è abbastanza controversa; è un gruppo polifiletico, che non deriva da un antenato comune.

Si ipotizza che i progenitori acquatici delle piante terrestri siano stati organismi simili alle alghe verdi; le prove sono due:1) le cellule delle alghe verdi presentano molto caratteristiche in comune con le viridiplante (clorofilla a,b, carotenoidi e xantofille nelle stesse proporzioni, amido, parete cellulare di cellulosa, flagelli a frustino; 2) le alghe verdi arrivano a 3omt di profondità, da dove è più facile un eventuale emersioen sulla terraferma.

Es.

gonius, alga verde coloniale, colonie di circa 16 cellule che si legano al substrato; cellule biflagellate.

Hematococcus, alga verde che presenta cellule co colorazione rossastra, forma rotondeggiante; biflagellate, i due flagelli si muovono in maniera diversa, facendo muovere la cellula in maniera incostante, quasi come saltasse. Il corpo cellulare si trova in una teca, rivestimento esterno rigido trasparente, connesso mediante ponti citoplasmatici al corpo cellulare. Il colore rosso del corpo cellulare è dovuto alla presenza di carotenoidi.

Pediastrium simplex, colonia a forma di rotella dentellata

Scenedesmus, colonie con stremità anteriore appuntita, posteriore rotondeggiante, le cellule si dispongono alternatamente con le estremità opposte.

Le feofite comprendono organismi di grandi dimensioni che comprendono un'organizzazione cellulare sifonale; sono quasi tutte alghe brune.

Rodofite, gruppo di alghe che comprende delle cellule con una parete cellulare costituita da carbonati di calcio, come si verifica nelle alghe coralline. Il colore rosso delle alghe è dovuto alla presenza di un pigmento di colore rosso, la ficobilina. Sono principamente marine (fino a 200mt)

Crisofita, comprende diatomee e alghe giallo-dorate.Le datomee sono bioindicatori della qualità dell'acqua; sono alghe unicellulari fotosintetiche prive di flagello, si muovono con lento movimento amebiode; hanno una parete cellulare di natura silicia, chiamata frustulo ed ha la formula di scatola con coperchio, con la faccia superiore chiamata epiteca e la parte inferiore ipoteca. Il frustolo delle diatomee è molto importante per via delle diverse applicazioni biotecnologiche.

Criptofita, pirrofita e euglenofita presentano organismi con caratteristiche intermedie tra organismi animali e vegetali; molte delle alghe mixotrofe sono in queste divisioni.

Esempi di alghe

Anisonema, alga con 2 flagelli, anteriore più lungo che trascina la cellula, posteriore trascinato.

Peranema, con flagello ricurvo all' estremità.

Phacus, corpo cellulare appiattito a forma di cuore

Closterium, caratteristica forma di falce.

Cosmarium, facilmente riconoscibile per una strozzatura nel corpo cellulare

Spirogyra, alga filamentosa costituita da tante cellule cilindirche una di seguito all'altra, con un cloroplasto spiriliforme interno.

L alghe unicellulari fanno parte del fitoplancton, alla base della catena alimentare; insieme ai batteri autotrofi marini, le alghe marine sono i principlai produttori autotrofi marii (circa metà dell' o2 in atm)

Le alghe unicellulari di acqua dolce o marine in particolari condizioni ambientali, possono andare incontro ad eutorfizzazione, dando origine ai bloom o fioriture algali o mucillaggini.

Dai frustuli di natura silicia si produce la farina fossile o diatomite, per levigature di precisione o nella produzione di filtri.

Dai polisaccaridi di alcune specie di alghe brune e rosse si ricavano i gel di coltura di laboratorio.

Le alghe sono usate anche per l'alimentazione umana.

Alcune alghe vengono utilizzate come modelli sperimentali di laboratorio, come acetabularia, alga unicellulare cenofitica multinucleata e differenziata in strutture;

I FUNGHI UNICELLULARI

Comprendono i mixomiceti o muffe mucillaginose e gli oomiceti o le muffe d'acqua, oltre che i microsporidi (coinvolti nelle endosimbiosi dei protisti)

I mixomiceti sono stati considerati funghi perché formano una struttura pluricelluarecellulare sporigena, spesso rivestita da strutture mucillaginose lo sporangio, che si proietta da substrato verso l'ambiente come i funghi superiori.

Differiscono per ambienti e forme di vita dai funghi veri, oltre che per analisi genetiche

Lo sporangio in comune rappresenta un esempio di evoluzione convergente in risposta a uno stimolo (in questo caso la necessità di far allontanare le spore e disperdere le spore nell'ambiente)

Imixomiceti ono forme ameboidi terrestri che vivono nel terreno umido, raramente superano i 3mm e hanno colori molto accesi, hanno complessi cicli vitali con fasi unicellulari e pluricellulari. Le diverse specie differiscono per forme e dimensioni dello sporangio oltre che per alcuni aspetti del ciclo vitale

Lo sporangio è suddiviso in tre parti: uan porzione basale con cui si fissa al substrato, l'ipotallo, lo stelo e una porzione apicale, il peridio, che contiene la columella attaccata alla quale si trovano le spore (apicalmente)

I cicli vitali principali sono 2: le differenze riguardano il plasmodio e la modalità con la quale lo sporangio produce le spore

Quando le condizioni ambientali sono favorevoli ciscuna spora germinando libera una cellula ameboide aploide che vive nel terreno vivendo di detriti organici e batteri, muovendosi con movimento ameboide. In alcuni casi alcune di queste cellule diventano biflagellate, formando una trasformazione transitoria. Quando le condizioni ambientali peggiorano, due cellule si uniscono per meiosi, formando lo zigote diploide. Questo continua a crescere includendo batteri e detriti organici, formando una struttura unicellulare plurinucleata, il plasmodio (una sorta di sincizio); è visibile come macchie arancioni sui tronchi in decomposizione

Quando tornano le condizioni ideali il plasmodio unicellulare si sviluppa in uno sporangio diploide che poi disperde le nuove cellule ameboidi aploidi (prodotte per meiosi).

Nell'altro ciclo vitale le spore sono prodotte per mitosi e lo sporangio è uno pseudosporangio (es. mixotelium micoideum)

Spora → cellule ameboidi aploidi → riproduzione sessuata e zigote diploide, per meiosi produce nuove cellule ameboidi aploidi, queste si aggregano senza fondersi formando lo pseudoplasmodio o lumaca, struttura pluricellulare aploide che lascia una scia viscosa muovendosi. Quando le ca sono favorevoli forma lo sporangio aploide che genera cellule aploidi che rilascia nello spazio cellule ameboidi aploidi.

OOMICETI

Organismi acquatici o terrestri, saprofiti o parassiti; sono statai cosiderati funghi per 2 motivi: sporangio e producono filamenti simili alle ifee funginee

Presentano 2 tipi di flagelli: a frustino e a pettine(con ramificazioni laterali); insieme ad alcune alghe sono raggruppati negli eteroconti

Presentano una parete cellulare con anche cellulosa. Hanno una gamia di tipo oogamia, cioè la fomrazione di gameti piccoli e mobili, biflagellate, zoospore e le oospore, grandi e immobili.

Molte specie sono patogene es. saprolegnalis, muffe acquatiche dei pesci, peronosfore della vite o della patata

Ciclo biologico (della peronosfora della vite): oosfore diploidi(nella foglia della pianta della vite, quiesciente fino alla fine dell'inverno) → oosporangio → (tramite meiosi)zoospore biflagellate → si portano nelle foglie della pianta della vite e dagli stomi causano l'infezione primaria (macchie giallastre sulla sup.inferiore) → conidiofori aploidi(muffa bianca sugli acini d'uva) → producono per mitosi zoospore biflagellate che si portano nelle altre foglie della stessa pianta → infezione secondaria → in autunno cond.amb sfavorevoli 2 zoosfore flagellate si uniscono per meiosi e diventano oosfore diploidi

PROTOZOI

Goldfus 1818, primi animali, progenitori di tutti gli animali, or. Unicellulari eucariotici, 35 mila specie viventi, 40.000 fossili

Specie marine, terresti e salmastre

Corpo

Memb cellulare esterna,: osmoregolazione, protezione

Glicocalice: materiale glicoproteico e saccaridico

Possono essere presenti la pellicola, formata da materiale plasmatico, la tunica, formata da materiale calcareo

I protozoi che vivono nel suolo, che sono soggetti a periodiche essicazioni, presentano un'altra struttura esterna, la cisti di resistenza, struttura esterna molto spessa che permette di resistere per mesi (Incistamento e excistamento)

Endoscheletro: microfilamentoso, microtubulare e alveolare.

A)Microfilamentoso: proteine filamentose sotto la memb cellulare che forma l'epiplasma, si ritrova in alcuni protozoi ciliati

B)Microtubulare: Mt, disposti in 3 modi diversi:

1)immediatamente al di sotto della memb cell., corsetto di microtubuli; si trova in tutti i ciliati e flagellati

2) dai corpi basali dei flagelli che formano uno scheletro assiale (assostiro); flagellati

3) possono associarsi in fasci che partono dal punto centrale della cellula, il centrosoma, e si irradiano nelle proiezioni della cellula, gli assopodi o assopodali; eliozoi e radiolari

C) Scheletro alveolare, con cavità a doppia parete subito sotto la memb. Cell. Con funzione strutturale; ci sono due tipi di alveoli: nei ciliati li alveoli sono vuoti, negli altri, come i dinoflagellati, sono rimpiti da piastre di cellulosa

Le creste mitocondriali possono essere tubulari(flagellati), lamellari o discoidali o vescicolari (amebe e grendaline)

I plastidi sono presenti nei protozoi flagellati autotrofi, equivalenti a quelli delle piante

Il nucleo è preesente in tutti i potozoi; i binucleati hanno due nuclei, uno vegetativo e uno riproduttivo; alcuni presentano stadi multinucleati

NUTRIZIONE

Saprozoica: ingestione di sostanze per assorbimento o pinocitosi

Olozoica: nutrizione di cibi solidi, come batteri e microalghe, per fagocitosi; questo processo consiste nell'ingestione di prede intere mediante il vacuolo alimentare. Quando una particella di cibo viene a contatto con la memrana si forma una invaginazione da cui origina il vacuolo alimentare, che viene trasportato mediante movimenti di ciclosi all'interno del citoplasma, viene circondato da lisosomi; la membrana dei lisossomi si fonde con quella del vacuolo alimentare permettendo agli enzimi litici di trasformare in sostanze nutritive il cibo; tramite la formazione per evaginazione di vescicole pinocitotiche, le sostanze nutritive al loro interno vengono portate alle varie parti della cellula; il vacuolo alimentare porta invece i residui di scarto della digestione all'esterno della cellula

Nei protozoi ciliati e in alcuni flagellati la fagocitosi non avviene in qualsiasi punto della membrana cellulare ma in corrispondenza del citostoma, spesso associato a membrane e membranelle formate da ciglia, in grado di filtrare l'acqua e trattenere le sostanze alimentari; può essere associato anche a mt nel citoplasma, in grado di convogliare nel vacuolo alimentare le particelle di cibo.

COMPLESSO VACUOLARE CONTRATTILE

Costituito da vescicole sferiche circondate da fibrille svolge un ruolo di osmoregolazione in maniera ritmica: si riempiono in diastole, si sgonfiano in sistole.

MOVIMENTO

Ciclosi: spostamento di vacuoli alimentari e vescicole pinocitotiche alle varie parti della cellula, provocando il movimento delle varie parti della cellula

Locomozione: ottenuta per mezzo di pseudopodi, ciglia o flagelli.

LA RIPRODUZIONE

Anche i protozoi hanno una grande varità di riproduzione sessuale e asessuale; Vantaggi sia dalla riproduzione sessuale che asessuale

La riproduzione asessuale avviene per divisione cellulare uguale o ineguale a seconda che le cellule figlie abbiano dimensioni uguali o diverse tra loro.

Un esempio estremo di divisione ineguale è rappresentato dalla gemmazione, una riproduzione asesssulae nella quale dalla cellula madre del protozoo si ha origine della cellula figlia distaccandosi.

LA RIPRODUZIONE Un'altra caratteristica dei protozoi oltre la forma, l'habitat ecc è la riproduzione. Queste creature rendono i protisti unici nel mondo vivente. Un aspetto importante del successo evolutivo sono state

le strategie riproduttive. Alcuni gruppi svolgono riproduzione asessuata, altri sessuale. Alcuni gruppi comprendenti forme parassite presentano cicli vitali complessi con i 2 tipi di riproduzione che si alternano).

RIPRODUZIONE ASESSUALE (O VEGETATIVA):

Nei protozoi avviene nella maggior parte dei casi x divisione cellulare, che può essere uguale o ineguale a seconda che le cell figlie hanno dimensioni approssimante uguali o meno tra loro. Un esempio di div cell ineguale è rappresentato dalla gemmazione, che consiste nella formazione di una estroflessione citoplasmatica che prende il nome di gemma, la quale poi si distacca e da origine ad una cell figlia (le 2 cell figlie hanno quindi dim diverse). Se il numero di cell figlie è uguale a 2 la div cell è binaria, se le cell figlie sono + di 2 si parla di div multipla o schizogonia. Nella riproduzione asessuale inoltre si ha sia la duplicazione o la moltiplicazione non solo del nucleo ma anche degli organuli citoplasmatici; inoltre si ha duplicazione e moltiplicazione degli organuli locomotori (ciglia e flagelli). Questi ultimi possono venire duplicati prima che avvenga della reale separazione delle cell figlie, in altri casi possono riformarsi dopo la separazione delle cell figlie.

Riproduzione asessuale dei **mastigofori o flagellati**: La riproduzione asessuale avviene soprattutto per div binaria longitudinale, con formazione di 2 cell figlie e piano di divisione è longitudinale al corpo cell. Dobbiamo distinguere forme uniflagellate e forme multiflagellate; nelle uniflagellate il flagello si duplica prima della div cell; nelle forme multiflagellate distinguiamo 2 casi:

a) i flagelli vengono persi prima della div cell x poi riformarsi ex-novo in ognuna delle 2 cell figlie;
b) oppure i flagelli vengono mantenuti e poi ripartiti tra le cell figlie in modo uguale o disuguale.

Ci sono anche casi particolari, come la riproduzione asessuale in alcuni dinoflagellati (come ceratium) in cui essa avviene per div binaria obliqua (piano div è obliquo al piano cell). In questo caso ciascuna delle 2 cell figlie conserva una parte della tunica (materiale calcareo) del genitore per poi riformare la parte mancante. Un altro esempio è quello di mastigofori è quello di tripanosoma, in cui si ha div multipla o schizogonia in cui i flagelli sono persi prima della div cell e poi si ha moltiplicazione delle cell figlie, che avviene all'interno della pellicola di rivestimento (questo stadio prende il nome di stadio di palmella).

Nei **sarcodini** (amebe) la riproduzione asessuale avviene per div binaria. Si distinguono amebe atecate (senza teca) e amebe tecate.

Nel primo caso avviene per div binaria con prima div nucleare e poi div citoplasmatica della cell madre, durante la quale le 2 cell figlie formano pseudopodi locomotori alle estremità opposte distaccando le cell figlie l'una dall'altra. Nelle tecate si distinguono 2 sottocasi: il guscio esterno si divide contemporaneamente alla div cell (meno frequente); nell'altro sottocaso una delle 2 cell figlie conserva la teca della cell madre mentre l'altra ne forma una nuova. Anche qui ci sono casi particolari come nel caso dell'entamoeba histolitica (ameba endosimbionte atecata). Qui la div cell avviene per schizogonia grazie alla formazione di grandi cisti riproduttive all'interno delle quali avviene la riproduzione delle tante cell figlie.

Nelle OPARINE si ha div binaria longitudinale oppure plasmotomia (da una cell madre multinucleata si forma 2 cell figlie multinucleate). Nei labirintomorfi si ha div binaria a volte con formazione di spore mobili.

Nei **ciliati** (che hanno dimorfismo nucleare con micro e macronucleo) la riproduzione asessuale avviene per div binaria, ma in alcuni casi si ha div multipla e gemmazione. Il micronucleo si divide per mitosi, mentre il macro si divide per allungamento e un taglio che divide le 2 cell figlie.

RIPRODUZIONE SESSUALE

Dà luogo alla variabilità genetica per far evolvere la specie al variare delle condizioni ambientali.

Negli organismi che svolgono riproduzione sessuale c'è bisogno di cell specializzate che sono i gameti, ma nei protozoi sono sufficienti anche solo i nuclei gametici. Nei protozoi qualunque cell può trasformarsi in gamete, anche se di solito si ha differenziamento di individui specializzati x produrre gameti o i nuclei gametici (sono chiamati gamonti). Si parla anche di specie monoiche o dioiche (gameti prodotti da stesso gamonte o meno). Anche nei protozoi possiamo distinguere diversi tipi di gamia, infatti se i gameti complementari sono uguali per forma, struttura e dimensione si chiamano isogametia, altrimenti si parla di anisogametia. In quest'ultimo caso se i gameti differiscono x dimensione il gamete più piccolo viene chiamato microgamete, mentre quello + grande si chiama macrogamete. Nell'anisogamia se il microgamete è anche mobile e il macro è immobile si parla di oogametia. Il punto chiave della riproduzione sessuale è la fecondazione che prende il nome nei protozoi di cariogamia, che consiste nella fusione di 2 nuclei gametici apolidi x formare un nuovo nucleo diploide che prende il nome di sincarion. Può esserci o non esserci la fusione dei citoplasmi e quindi la formazione o meno di uno zigote diploide. [nei protisti basta che si fondano i nuclei gametici].

Possiamo distinguere 3 tipi di fecondazione: gametogamia, autogamia e gamontogamia.

1) Nella gametogamia si fondono i gameti liberi per lo + natanti

2) Nella autogamia, i gameti o i nuclei gametici che si fondono provengono dallo stesso gamonte

3) In cui 2 gamonti si uniscono prima di produrre i gameti.

Nei protozoi parassiti si puo avere l'alternanza di generazione, che può essere di 3 tipi: eterofasica o omofasica (le 2 generazioni hanno la stessa fase nucleare che può essere aplo o diplo)

1) alternanza di generazioni aplo-omofasica (sporozoi);

2) Diplo omofasica (eliozoi);

3) Eterofasica (foraminiferi);

[la fase 2n è indicata con 2 nuclei; f sta per fecondazione; s per sincarion; m per mitosi] [guarda slide]

Riproduzione sessuale nei **protozoi ciliati** (nel paramecio) [come avviene la coniugazione nel paramecio]

1) 2 cell di paramecio (ognuna con micro e macronucleo) quando le condizioni sono sfavorevoli entrano in coniugazione e si uniscono attraverso le loro zone orali. Si parla di coniuganti

2) In ciascun coniugante il macronucleo degenera mentre il micronucleo diploide si divide 2 volte x meiosi formando 4 nuclei aploidi.

3) Di questi 4 3 degenerano e ne rimane 1 aploide che subisce una mitosi disuguale formando 2 nuclei gametici di dimensioni diverse, uno + piccolo e uno + grande (nucleo migrante e nucleo stazionario). Il nucleo migrante di ciascun coniugante migra nell'altro coniugante .

4) Ogni nucleo migrante si fonde con lo stazionario dell'altra cellula e si forma un syncarion diploide.

5) Le 2 cellule si staccano e prendono il nome di ex-coniuganti.

6) Il syncarion diploide si divide 3 volte per mitosi formando 8 nuclei diploidi

7) 4 diventeranno macronuclei, degli altri 4, 3 degenerano e uno rimane come micronucleo che si divide 2 volte formando 4 micronuclei

8) Il micronucleo e l'animale si dividono x produrre 4 individui ognuno dei quali riceve un micronucleo.

È una gametogamia, quindi tra 2 gameti liberi.

Es. coniugazione in Euplotes: verificare le diverse specie filogeneticamente

Analisi e formazione dell'albero filogenetico, che si divide in diversi ceppi (A,B,C) a diversi nodi

→ a cosa sono collegate le diverse divisioni

Incroci tra ceppi di gruppi A e di gruppi B e tra loro per vedere se si accoppiano (marcati con alghe e protozoi all'interno)

Studio le differenze nucleotidiche tra i geni (max 40 mutazioni nello stesso ceppo di più tra ceppi diversi)

Scambio genico solo tra gruppo e gruppo A, non con gruppo B o C.

08/10/20

PROCESSI MICROBIOLOGICI

In passato dal punto di vista storico si intendeva con questo termine quei processi della fermentazione alcolica, cioè processi operati da microorganismi come i lieviti che portavano alla trasformazione di substrati zuccherini in etanolo e CO2. In seguito a questi processi si ottenevano prodotti dell'industria alimentare (grappa, pane, vino, birra ecc). Successivamente per processi microbiologici si intendevano i meccanismi fatti da microorganismi indipendentemente dal fatto che siano aerobi o meno, per ottenere beni e servizi **in condizioni controllate**. Un processo microbiologico è divisibile in 2 fasi: - fase di reazione o di biotrasformazione (upstream) —> ciò che l'organismo va a fare - Fase di isolamento o di recupero del prodotto (downstream) —> comprende le procedure che seguono la fase di biotrasformazione. Un processo microbiologico è schematizzato come S + X—> P [Substrato + cellule —> Prodotto]

Vediamo i parametri coinvolti:

X ——> i microorganismi che vengono utilizzati inizialmente erano popolazioni miste di specie diverse, presenti in ambienti diversi (nelle materie prime, in ambienti complessi). Non si conosceva la specie che dava il prodotto, neanche il meccanismo con cui P si formava. Successivamente nel tempo, uno volta individuati i meccanismi e i microorganismi responsabili della formazione del prodotto, si è passati ad utilizzare monocolture pure di microorganismi. Con lo sviluppo di ingegneria genetica si usano anche microrganismi ricombinanti, con lo scopo di aumentare la resa del prodotto e di incrementarne la produttività. In alcuni casi la scelta del microorganismo deve tener conto di alcuni limiti/leggi di sicurezza (ciò vale per i processi in cui si vuole ottenere un prodotto alimentare —> si utilizza microrganismi GRAS cioè riconosciuti come non nocivi).

I microorganismi posso procurarli in 2 modi:

- 1) ricorrendo alle collezioni ufficiali (istituzioni pagate che hanno il compito di collezionare i ceppi di microorganismi esistenti e di fornire quelli nuovi [non attuabile se ceppo è poco produttivo, non ho soldi o ceppo non c'è nelle collezioni];

- 2) vado a cercarlo in natura, cercando il ceppo alto produttore conoscendo la biogeografia dei protisti, la biodiversità e la distribuzione geografica. Ci sono 2 ipotesi alternative per la biogeografia:

A) IPOTESI COSMOPOLITA: Alcuni sostengono che ci sia un basso numero di specie di microorganismi, le quali hanno elevati tassi di dispersione e flusso genico. Inoltre queste specie hanno dimensioni assolute di popolazione molto grandi. La prova a questa ipotesi è che alcune specie sono cosi piccole che hanno sia la velocità sia la distanza geografica di dispersione talmente elevata da essere ovunque nel mondo;

B) IPOTESI ENDEMICA: Dice l'opposto di quella cosmopolita. La biogeografia è caratterizzato da un elevato numero di specie, con ridotti tassi di dispersione e flusso genico. Le specie quindi sono dotate di dimensioni assolute di popolazione molto piccole. La prova è che ogni mese si scoprono nuove specie e che esistono specie bandiera, che hanno una distribuzione endemica (queste specie hanno caratteristiche talmente uniche che in una zona io non posso non vederle).

Non si trova un punto di incontro tra le 2 ipotesi per la presenza di 2 fattori che sono l'elevato numero di specie che rientra nel gruppo Protisti e la limitata risoluzione tassonomica a livello di specie (non si sa ancora bene quali sono i confini della vera unità evolutiva).

Parlando di distribuzione geografica di Euplotes hanno studiato morfologia, genetica, distribuzione….

La conclusione è una via di mezzo tra le due teorie; ci sono diverse morfospecie ma non vere specie; il punto di raccordo è il fatto che non tutti gli habitat sono adatti all sopravvivenza della specie, ma soltanto quelli che presentano una nicchia ecologica adatta.

S -→ Sono forniti sotto forma di ingredienti grezzi, che variano sia a livello qualitativo sia a livello quantitativo da uno stock ad un altro.

P ——> La scelta del prodotto dipende dalla scoperta del prodotto e dalla richiesta del mercato: nel caso di prodotti a bassa richiesta (basso medio valore aggiunto) assume una grande importanza l'economicità del processo (deve essere molto economico perché poco richiesto), la sua resa e le procedure di recupero del prodotto.

I prodotti sono classificati in base a criteri soggettivi: - Cellule intere (biomassa) - Prodotti a basso peso molecolare: *metaboliti primari *metaboliti secondari * molecole ottenute per biotrasformazione con cellule non proliferanti - Prodotti ad alto peso molecolare: *polisaccaridi *lipidi *proteine

Ma sono classificati anche su base metabolica: - 1) Biomasse microbiche (catena di reazioni degradativi-energetiche e assimilative biosintetiche) - 2) Metaboliti primari (catena di reazioni del metabolismo energetico primario) - 3) Metaboliti secondari (catena di reazioni del metabolismo biosintetico secondario) - 4) Enzimi - 5) Prodotti complessi (prodotti non isolatili, utilizzati in toto) - 6) Prodotti ottenuti per biotrasformazione.

1)) Le BIOMASSE MICROBICHE sono le cellule stesse, che sono prodotte o in funzione del contenuto o in funzione dell'attività su substrati colturali diversi. Se le masse microbiche vengono prodotte in funzione del contenutosi distingue impiego integrale(usate le cellule stesse pellettate) e impiego per estrazione(da lisi estrai ciò che serve). Nella colonna a dx si distingue substrati complessi e molecole particolari.

2)) METABOLITI PRIMARI: Sono composti essenziali per la vita e la riproduzione delle cellule. Possono essere prodotti intermedi del metabolismo aerobio. L'accumulo avviene contemporaneamente allo sviluppo microbico(acido lattico) o in una fase successiva(acido citrico).

3)) METABOLITI SECONDARI: Non sono essenziali ma promuovono la crescita e hanno attività antibiotica, oltre ad attività biologiche diversificate (immunomodulanti, antitumorali). Altri invece inibiscono selettivamente alcune attività enzimatiche (sono inibitori dell'attività proteasica). Hanno biosintesi diversa dai metaboliti primari, possono accumularsi contemporaneamente o dopo lo sviluppo microbico.

4)) ENZIMI: Sono tanti quelli ottenibili Utilizzando microrganismi geneticamente modificati è possibile regolare la modalità di attivazione. A seconda delle specie possiamo avere una localizzazione enzimatica extra(es. bacillus, amilasi, proteasi) o intracellulare (es. e.coli) o di superficie (es. disaccaridasi da saccaromices).

5)) PRODOTTI COMPLESSI: Non sono isolatili perché costituiti dal substrato trasformato + microrganismo (yogurt).

6)) PRODOTTI OTTENUTI PER BIOTRASFORMAZIONE: Sfruttano attività catalitica degli enzimi. Svolgono reazioni di modificazione degli steroidi e reazioni di ossidazione stereoselettiva (produzione di acido glucosio da glucosio, ossidazione del sorbitolo a sorbosio nella produzione di vitamina C).[Biocatalizzatori]

In alcuni cas lo stesso prodotto può essere ottenuto da specie diverse dello stesso genere (es.biocina) o anche da generi diversi(es.B12). Una stessa specie può produrre specie diversi (es. aspergillus niger, lactobacillus…).

BIOREATTORE

In generale un bireattore è costituito da un reattore cilindrico ad asse verticale (la maggior parte). Il volume utile per la brodocoltura/reazione è 2/3 della capacità totale. Lo spazio non occupato dalla brodocoltura prende il nome di testata o cupola ed è riempita ad aria. Il bireattore è dotato di un certo numero di entrate e uscite che sono provviste di valvole che possono essere automatiche o manuali. Entrate e uscite sono utilizzate per scopi diversi durante il processo. Queste entrate (F) vengono usate per l'ingresso dei nutriliti.

La testata (H) è un'apertura utilizzata per l'uscita dei gas; è associata ad un sistema di refrigerazione che controlla gli effetti dovuti all'evaporazione (mantiene costante il livello della brodocoltura). Sempre all'uscita dei gas è associato un manometro che mantiene la pressione interna del bireattore in leggera sovrimpressione (di 0,5 atm) rispetto all'esterno: ciò favorisce la sterilità all'interno del bireattore. Sempre in alto è presente una botola utilizzata per l'osservazione del processo microbiologico. Il bioreattore possiede anche un dispositivo che serve per i prelievi di brodocoltura: la sua localizzazione varia a seconda delle dimensioni del bioreattore.

Il bioreattore è dotato di dispositivi per il controllo (misurazione e regolazione) delle diverse variabili che compaiono nel corso del processo microbiologico e questi dispositivi possono essere sia meccanici che elettronici.

Le variabili di cui parliamo sono:

Generalmente è un sistema di tipo elettronico in grado di controllare online o offline il sistema. Lo strumento utilizzato per verificare la variazione è il biosensore, fomato da biocatalizzatore e trasduttore. Sono parte di un'unica sonda, nella quale sono separati da una membrana interna che li mette in comunicazione.

Generalmente per rilevare questi parametri si usano dei biosensori e sono costituiti da un biocatalizzatore e un trasduttore, separati da una membrana interna.

L'elemento biologico (biocatalizzatore) compie una reazione di biotrasformazione, trasformando S in un'altra sostanza P. A questo punto si può verificare il cambiamento di un elemento della brodocoltura (come pH, T, colore ecc). La nuova sostanza P e l'elemento che è cambiato vengono avvertiti tramite la membrana interna dal trasduttore. Quest'ultimo li trasforma in un segnale, la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di sostanza S che è stata biotrasformata. Il biocatalizzatore può essere costituito da cellule o frammenti di cellule, ma anche da anticorpi, enzimi, tessuti ecc. Il trasduttore può essere ottico, calorimetrico ecc a seconda del segnale che emette.

Caratteristiche importanti di un biosensore sono l'agitazione e l'ariazione.

1)) AGITAZIONE L'agitazione ha la funzione di mantenere omogenea la brodocoltura, impedendo la deposizione sul fondo delle molecole e impedendo quindi la formazione di gradienti di concentrazione all'interno del biosensore. Ciò è importante anche nei processi aerobici, permettendo una migliore diffusione dell'ossigeno in tutta la brodocoltura. L'agitazione è ottenuta attraverso particolari dispositivi detti agitatori, costituiti da 3 parti principali: un motore (genera F centrifuga) situato nella parte alta del bioreattore; un albero portante che entra nel bioreattore con delle guarnizioni dette premistoppa (entrata a tenuta) per impedire l'entrata di contaminanti; giranti (D) sono la parte terminali che danno origine all'agitazione. In alcuni casi l'agitazione può essere ottenuta per effetto della risalita del flusso dell'aria che viene introdotta alla base del bioreattore tramite uno sparger (ciò solo nei processi aerobici).

All'interno del bioreattore possono essere installati ai lati delle lamine verticali chiamate antivortici o frangifrutto (E) che riducono l'agitazione per evitare la formazione di un vertice centrale.

Gli agitatori possono essere veloci o lenti (in base alla velocità periferica delle giranti stesse). Quelle veloci possono essere a palette, a elica marina o a turbina (Rushton). Allo stesso modo quelli lenti (usati per viscosità medio-alta) possono essere ad ancora, a pettine o a gabbia.

2)) AEREAZIONE

Usata per fornire ossigeno alle cellule microbiche tramite la cosiddetta "linea dell'aria", che può essere + o - complessa a seconda del processo: troviamo un compressore che genera aria a cui è associata una valvola riduttrice (regola flusso dell'aria) e un manometro (regola pressione dell'aria). A questo punto l'aria deve essere sterilizzata tramite dei filtri sterilizzanti che sono la cosa più cara del processo microbiologico, la loro durata è fondamentale quindi e per questo si fa in modo che l'aria che arriva a questi filtri sia già parzialmente sterilizzata. Ciò è svolto dalle procedure di desoliatura , deumidificazione e prefiltrazione.

L'aria poi viene filtrata dai filtri veri e propri e passa attraverso un fustimetro che regola il flusso dell'aria sterilizzata, che entra nel bioreattore dal basso tramite lo sparger, suddividendo l'aria in tante bolle. Questo sparger in base alla forma può essere di 3 tipi: anulare, a pettine o a semplice uscita sotto la girante. Devo calcolare ovviamente la pressione e il flusso corretto da introdurre nel bioreattore.

Le molecole di ossigeno devono passare dalla fase gassosa delle bolle alla fase liquida della brodocoltura e da qui all'interno delle cellule microbiche. In questo passaggio le molecole trovano delle resistenze fisiche che sommate insieme formano la resistenza globale di trasferimento, indicata con R. Questa è costituita da una prima serie di resistenze dovute al passaggio dalla fase gassosa alla fase liquida (troviamo 4 resistenze in questo primo percorso: R1 incontrata nel passaggio del film della bolla d'aria; R2 incontrata nel passare l'interfaccia gas-liquido della bolla d'aria; R3 dovuta al film liquido che riveste esternamente la bolla d'aria; R4 dovuta al passaggio nella fase liquida della brodocoltura) La seconda serie comprende 3 resistenze: R5 è dovuta al film liquido che riveste le cellule microbiche; R6 è dovuta alle strutture cellulari della cellula; R7 è dovuta alla compartimentazione degli enzimi respiratori nei mitocondri (dovuta al passaggio della doppia membrana mitocondriale).

IMMOBILIZZAZIONE DI CELLULE MICROBICHE

E' una procedura utilizzata nei processi biologici e consiste nell'immobilizzare delle cellule microbiche su un supporto solido, introducendo il tutto poi nel bioreattore. Questo supporto fa quello che farebbero gli enzimi:

di queste cellule microbiche si sfrutta una determinata attività catalitica (è una valida alternativa all'impiego di enzimi sintetici).

Può essere o il risultato di un fenomeno naturale o può essere una procedura artificiale. Nel primo caso sfrutto la naturale tendenza di alcuni tipi di cellule ad aderire su un supporto solido; nel secondo caso creo io una procedura per far aderire le cellule microbiche al substrato. I vantaggi dell'immobilizzazione sono:

Ci sono però anche svantaggi:

-alcune cellule possono staccarsi;

-attraverso le reazioni secondarie posso ottenere prodotti che non voglio, il che diminuisce la resa del prodotto principale e interferiscono le procedure di recupero del prodotto che voglio

-può creare situazioni di disagio a livello di pH.

Per far si che una procedura di immobilizzazione venga utilizzata deve avere dei particolari requisiti:

Queste procedure possono essere divise in 2 classi principali: procedure passive e procedure attive

Quelle passive si basano su metodi fisici e le cellule sono legate in modo più blando e leggero sul supporto (solitamente). Sono 3:

1))Meccanismo dell'aggregazione sfrutta la naturale tendenza di alcune cellule di aggregarsi su un supporto solido poroso durante una fase del loro ciclo vitale

2)) Meccanismo della colonizzazione sfrutta la tendenza di alcune cellule di colonizzare un supporto solido come conseguenza dello sviluppo microbico, dove formano un film microbico che viene adeguatamente controllato.Il flusso della fase liquida è determinato dal sistema di agitazione, il quale stacca le cellule dal film cellulare agendo con azione abrasiva (svolta anche dal flusso della fase gassosa) [spessore costante = attività catalitica costante]

3)) Meccanismo dell'assorbimento: in questo caso la fase solida viene chiamata Carrier e l'adesione delle cellule avviene grazie a forze elettrostatiche (forze di van Der waals). Il Carrier può essere costituito da resine sintetiche o da materiali naturali (cellulosa, composti di amido detti destrami che sono polimeri di amilopectina).

Quelle attive si basano su meccanismi chimici e sfruttano i legami covalenti che si vengono a creare. Sono 3:

1)) Meccanismo del legame covalente con matrice insolubile è basato dalla formazione di legami chimici stabili tra le cellule e il supporto. Per la loro stabilità non si hanno problemi di diffusione ma l'attività catalitica può essere danneggiata dalla formazione di questi legami covalenti, che può portare anche alla morte delle cellule.

2)) Meccanismo dell'intrappolamento si basa sull'intrappolamento delle cellule microbiche all'interno dei pori di una matrice in forma di gel. Le cellule vengono mescolate all'agente polimerizzante in gel (scelto in maniera tale che i pori abbiano dimensioni adatte per far fuoriuscire il prodotto ma non le cellule), avviene la polimerizzazione e le cellule rimangono intrappolate nei pori del gel. Uno svantaggio è che alcune cellule possono diffondere.[nonostante non ci siano legami chimici è presente un processo di polimerizzazione]

(domanda da esame: perché viene considerato attivo se tra le cellule e il supporto non si hanno legami chimici covalenti? Sono i meccanismi chimici nel legame del supporto che lo fanno essere attivo)

3)) Meccanismo del cross-linking sfrutta legami chimici intermolecolari tra le cellule, che vengono favoriti grazie all'aggiunta di un agente reticolante, che fa da ponte tra le cellule da immobilizzare ed è costituito da sostanze chimiche a basso peso molecolare come la gluteraldeide.

Esiste anche una terza classe di procedure ed è chiamata SISTEMA DI CONFINAMENTO CELLULARE A MEMBRANA: è considerata a parte poiché le cellule microbiche non vengono immobilizzate su un supporto ma vengono confinate/trattenute all'interno di una membrana semipermeabile, i cui pori consentono la diffusione del prodotto e del substrato colturale ma non la fuoriuscita delle cellule.

Sono stati realizzati bireattori specifici per queste classi:

- [1] Bioreattori di superficie, per sistemi immobilizzati ottenuti per colonizzare e assorbimento (passive)

- [2] Bioreattori a letto fisso o fluido, per sistemi immobilizzati ottenuti per intrappolamento (attive)

- [3] Bioreattori a membrana, per sistemi immobilizzati ottenuti per sconfinamento (3a classe)

[1] Tipico è il bioreattore a tamburo. La superficie del tamburo funziona da supporto per le cellule che vi si immobilizzano per colonizzazione o adsorbimento, andando a formare un film. Il funziomento si basa sulla rotazione del tamburo.

[2a] Sono cilindrici ad asse verticale. All'interno ci sono dei dispositivi di ritenzione che creano uno spazio delimitato completamente occupato dalle celluleimmobilizzate.

[2b] E' simile al [2a] ma non vi sono sistemi di ritenzione e il gel è libero di muoversi, facendo muovere quindi anche le cellule. Ha maggiore efficienza e resa a causa del rimescolamento.

[3] Sono rappresentati dal reattore a fibre cave: reattore cilindrico ad asse verticale al cui interno vi sono fibre cave che hanno dei pori che impediscono la fuoriuscita di cellule.

CINETICA DEI PROCESSI MICROBIOLOGICI =Studio delle velocità delle reazioni metaboliche

E' importante conoscere la cinetica per vari motivi:

1) Conoscere con quale velocità i microrganismi si nutrono

2) Conoscere via metabolica, tempo di formazione del prodotto

3) A che punto si trova lo sviluppo cellulare

Per studiare la cinetica si usa la curva di crescita che esprime lo sviluppo microbico in funzione del tempo. La curva varia a seconda del microrganismo usato.

Ci sono 6 fasi:

1)Latenza—> adattamento. Coltura cellulare costante nel tempo

2)Accelerazine

3)Crescita esponenziale

4)Decelerazione

5)Stazionaria

6)Declino

[LATENZA] (1) La latenza è una breve fase di adattamento se il terreno colturale e le condizioni di crescita sono uguali a quelle dell'inoculo, o se uso molto inoculo ed esso è effettuato con una coltura in fase di crescita esponenziale. Altrimenti è prolungata.

[ACCELERAZIONE] (2) La fase di accelerazione è quella in cui la coltura inizia a svilupparsi e le reazioni metaboliche sono all'equilibrio.

[Crescita esponenziale] (3) In questa terza fase c'è la duplicazione del numero di cellule e la velocità in questa fase raggiunge il valore massimo (la pendenza della retta). La durata della fase varia a seconda di fattori come la concentrazione dei nitriti e l'affinità del microrganismo con il substrato colturale. A tale proposito, quando nei processi si usa un terreno complesso come substrato, posso avere 2 o più fasi di crescita esponenziale intervallate da 2 o più fasi di accelerazione. Questo fenomeno si chiama diauxia e si verifica perché quando sono presenti 2 componenti diversi nel terreno, uno dei 2 è consumato per primo. Finito questo si ha una fase di accelerazione dove si ha l'induzione degli enzimi per il catabolismo del secondo componente. Con questa fase finisce la trofofase (metabolismo primario) e inizia l'idiofase (metabolismo secondario).

[DECELERAZIONE] (4) La quarta fase vede la velocità di crescita diminuire e qui si ha una diversa composizione della biomassa. Essa la più importante a livello industriale perché si ha il massimo valore di prodotto (i processi industriali si interrompono alla fase 5).

[DECLINO] (6) La sesta fase è caratterizzata dalla diminuzione del numero cellulare dovuto a lisi. Qui si ha l'esaurimento dei nutrienti e il termine della produzione.

Conta di aliquote per vedere i tempi di crescita: 3 campionamenti x 2 operatori in diversi momenti, andando poi a reare la curva di crescita definendo le fasi in base al numero di cellule

CLASSIFICAZIONE DEI PROCESSI SU BASA CINETICA

La classificazione si basa su 3 parametri (velocità specifiche):

1) Crescita cellulare

2) Consumo di substrato

3) Formazione del prodotto

Gaden suddivide i processi in 3 classi: tipo 1,2 e 3 considerando i 3 parametri precedenti.

TIPO 1 —> I prodotti ottenuti derivano direttamente dalla trofofase, sono prodotti semplici derivanti dal metabolismo primario. In questi processi le 3 velocità specifiche raggiungono il max più o meno contemporaneamente (sono sovrapponibili). Esempio: acido lattico.

TIPO 2 —> I prodotti derivano indirettamente dal metabolismo primario (acido citrico) e inoltre le curve sono più complesse e hanno max diversi (non sovrapponibili). Il substrato viene usato per la crescita e raggiunge la velocità max nella prima fase, sono nella seconda fase il substrato è usato per produrre la cosa voluta (idiofase).

TIPO 3 —> Come nel tipo 2 i valori max dei 3 parametri si raggiungono in fasi diverse. Nella prima fase ho la trofofase con velocità max di crescita e consumo del substrato. Nella seconda fase (idiofase) ho solo velocità max di formazione del prodotto.

CLASSIFICAZIONE DEI BIORETTORI IN BASE ALLA CINETICA

Secondo un primo schema si divide i reattori in 2:

(A) Discontinui butch (chiusi)

- Continui aperti Questi ultimi si dividono a loro volta in (B) Fed-butch e (C) Continui

I discontinui chiusi (A) sono quelli in cui non posso avere né ingresso di substrato né uscita di prodotto durante il processo.I discontinui possono avere tempi morti nel processo (non c'è produzione né consumo di substrato) e ciò è uno svantaggio perché spreco energia. Tuttavia come vantaggio ho che non può esserci contaminazione.

Nei FED-BUTCH (B)posso avere ingresso di substrato ma non uscita di brodocoltura.

Nei CONTINUI (C) posso avere sia ingresso che uscita.

I continui aperti non hanno tempi morti perché gestiti da computer, hanno una maggiore resa, danno un prodotto più omogeneo e sono adattabili ai sistemi di controllo (posso usare sonde). Essi richiedono meno personale, che però deve essere più specializzato. Secondo un secondo schema si distinguono 2 tipi di reattori:

- Omogene

i – Eterogenei

I primi sono quelli in cui non ho differenze nella concentrazione di substrato e nella concentrazione delle cellule, non si creano gradienti nel volume della brodocoltura. L'uniformità è garantita dal sistema di agitazione.

Reattore STR

I secondi presentano gradienti di concentrazione sia nel substrato sia nelle cellule. Reattore tubolare a forma cilindrica. Le cellule si stratificano esternamente e il prodotto si trova al centro.

Secondo un terzo schema distinguiamo reattori:

- Monostadio

- Multistadio

Nei monostadio c'è la formazione del prodotto associata alla crescita cellulare (in contemporanea). Qui avvengono i processi di tipo 1 secondo Gaber. Nei multistadio non c'è contemporaneità , come nei processi di tipo 2 e 3. Sono anche detti sistemi bistadio. Nel primo reattore avviene la trofofase e poi ciò che si ottiene è usato come inoculo in un secondo reattore, dove avviene la formazione del prodotto. Entrambi i processi sono omogenei in ciascuno dei loro stadi.

MECCANISMI COINVOLTI NELLA PRODUZIONE DI METABOLITI MICROBICI

In alcuni casi è possibile che non riusciamo ad ottenere dai microrganismi quantità di prodotto significative a livello industriale. Io come operatore posso utilizzare delle procedure per far si che il microrganismo produca una grande quantità di prodotto. Queste procedure si basano sui meccanismi che descriveremo adesso. Per vedere questi meccanismi è necessario conoscere il metabolismo microbico.

Dai vari microrganismi si possono ottenere diversi prodotti sfruttando il metabolismo microbico, che è il contributo della fase catabolica (degradazione) e della fase anabolica (di sintesi).

La fase catabolica è il principale processo a cui si lega la produzione di energia e di ATP quindi, che viene utilizzato nella fase anabolica. La fase catabolica genera anche il potere riducente, usato poi nell'anabolismo. Il potere riducente è legato all'ossidazione di NAD+ a NADH. Il metabolismo (anaerobico o aerobico) può variare per i prodotti ottenuti, l'energia utilizzata e nelle modalità di riduzione del NADH. Nella fase catabolica solitamente è utilizzato il NAD, il NADP per la fase anabolica.

METABOLISMO ANAEROBICO

Da esso si ottengono prodotti finali che vengono accumulati spontaneamente nell'organismo come acido lattico e butirrico. Si ha bassa produzione di ATP. Il potere riducente (nad ridotto) viene riossidato trasferendo gli elettroni dell'atomo di H A DEGLI INTERMEDI CHE VENGONO RIDOTTI PORTANDO AI PRODOTTI FINALI.

METABOLISMO AEROBICO

I prodotti sono ottenuti solo con specifiche procedure in alte quantità, altrimenti sono pochi.

Si possono avere 2 prodotti:

- costituenti cellulari —> sono prodotti in eccesso rispetto alle esigenze delle cellule e sono conservati all'esterno a all'interno della cellula. Comprendono vitamine, acidi organici, lipidi, polisaccaridi endocellulari

-metaboliti —> sono accumulati all'esterno della cellula e non hanno una funzione definita. Comprendono antibiotici, alcaloidi, enzimi extracellulari e polisaccaridi.

Da questo metabolismo solo una parte di substrato è utilizzata e quindi si produce molta energia. Gli elettroni del NADH sono trasferiti all'ossigeno con la formazione di acqua. I prodotti ridotti non si accumulano.

Le procedure si basano sul controllo degli enzimi da cui dipendono i processi metabolici.

Esistono 3 tipi di enzimi da prendere in considerazione: enzimi costitutivi, inducibili e reprimibili.

1) Sono sempre sintetizzati, indipendentemente dalle condizioni del terreno di coltura.

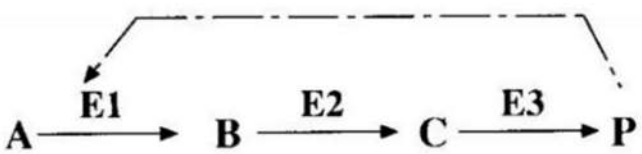
2) Sono sintetizzati soltanto in presenza nel terreno di un induttore. Il prodotto dell'attività di un enzima può indurre la sintesi di un altro enzima con un meccanismo detto sequenziale.

3) Sono sintetizzati nella fase anabolica (fase di biosintesi) e sono sensibili alla concentrazione del prodotto dell'attività dell'enzima. I prodotti che abbassano i livelli di enzimi reprimibili sono detti co-repressori.

Per vedere i sistemi di controllo dobbiamo distinguere 2 tipi di via metabolica:

-lineare —> porta alla formazione di un unico prodotto

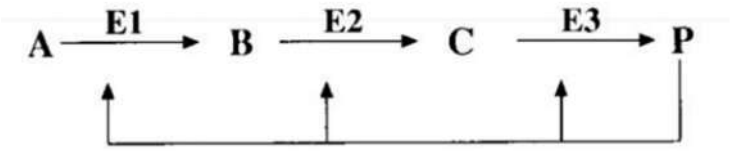
-ramificata —> porta alla formazione di 2 o + prodotti



[1. INIBIZIONE DA FEEDBACK IN UNA VIA METABOLICA LINEARE]

Consiste nell'inibizione esercita dal prodotto finale sull'attività di un enzima che catalizza una delle reazioni

(generalmente la prima reazione). Il prodotto finale interagisce con il sito allosterico dell'enzima, che non si lega più al suo substrato (qui A)

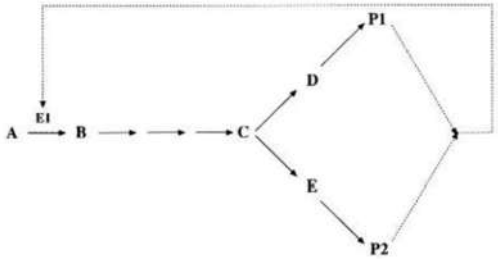


[2. REPRESSIONE DA FEEDBACK IN UNA VIA METABOLICA LINEARE]

Consiste nella repressione esercitata dal prodotto finale sulla sintesi di 1 o + enzimi che catalizzano 1 o + reazioni che caratterizzano la via metabolica. Il meccanismo avviene a livello dei geni dell'enzima(agisce sulla sintesi dell'enzima), impedendo la trascrizione dell'RNA messaggero.

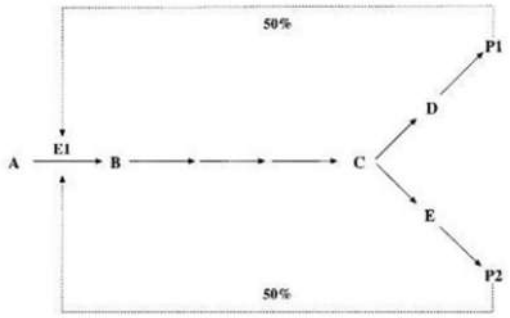
IN UNA VIA RAMIFICATA individuiamo 4 tipi di repressione da feedback e un'unica inibizione da feedback.

I 4 tipi di repressione da feedback sono:

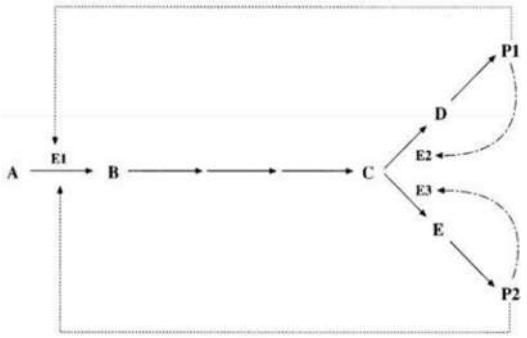


- FEEDBACK CONCERTATO O MULTIVALENTE —> consiste nella repressione esercitata dall'azione della somma dei prodotti finali (P1+P2) sulla sintesi dell'enzima che catalizza la prima reazione della via metabolica (E1).

- FEEDBACK COOPERATIVO —> Simile al concertato, ma in questo caso la repressione è dovuta all'effetto di livelli significativi di un singolo prodotto. Cooperativo perché viene repressa

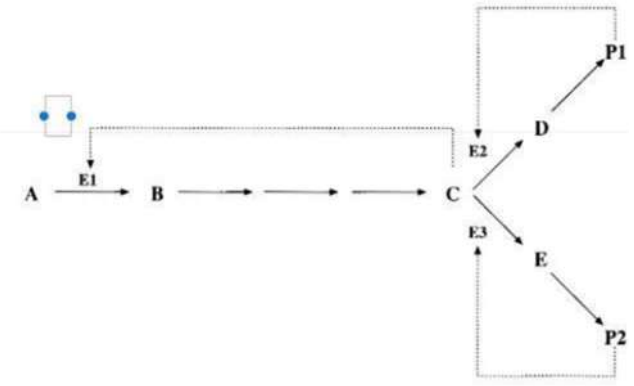


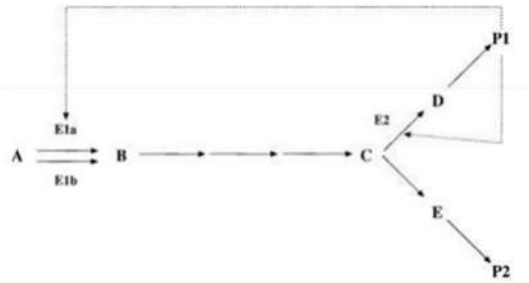
-



FEEDBACK CUMULATIVO —> consiste nella repressione parziale esercitata da ciascun prodotto finale (P1 E P2) sulla sintesi dell'enzima che catalizza la prima reazione ma in misure indipendenti l'uno dall'altro.

- FEEDBACK SEQUENZIALE —> consiste nella repressione esercitata da ciascun prodotto finale sulla sintesi dell'enzima che catalizza la prima reazione della corrispondente via metabolica lineare dopo la ramificazione. Impedisce la conversione del prodotto intermedio C in D ed E, C si accumula e inibisce l'attività dell'enzima che catalizza la prima reazione (E1) dell'intera catena ramificata. In questo caso si dice che c'è repressione nella parte ramificata e inibizione nella parte lineare.





Inibizione da feedback in una via metabolica ramificata

Se una o più reazioni sono catalizzate da isoenzimi, l'inibizione consiste dall'inibizione esercitata da un singolo prodotto sull'attività di una delle forme enzimatiche che catalizzano la prima reazione. Lo stesso prodotto inibisce anche l'enzima della rispettiva via lineare. Tale meccanismo porta all'accumulo degli altri prodotti, che non hanno esplicato l'inibizione.

PROCEDURE IMPIEGATE PER L'OTTENIMENTO DEI METABOLITI SECONDARI

Oggi studiamo le procedure che vengono applicate per ottenere metaboliti che non vengono spontaneamente accumulati all'interno delle cellule dell'organismo, come abbiamo visto a proposito del metabolismo aerobico visto nella lezione precedente.

Le procedure si basano sui meccanismi di controllo a feedback.

Distinguiamo procedure per ottenere metaboliti primari [1] e per ottenere metaboliti secondari [2]:

[1] Sono di 3 tipi:

a. Modificazione della permeabilità cellulare —> Si applica intervenendo nella membrana cellulare del microrganismo (ma anche tunica,glicocalice ..), in particolare modificando la selettività della struttura esterna del rivestimento, ottenendo la fuoriuscita di un prodotto che normalmente viene sintetizzato e accumulato all'interno della cellula. Questa fuoriuscita di prodotto va a rimuovere a livello intracellulare gli eventuali fenomeni di inibizione e repressione, correlati ai sistemi di controllo da feedback. Esistono procedure diverse in base al microrganismo e al tipo di membrana esterna

b. Rimozione del blocco metabolico —> si interviene creando un microrganismo con caratteristiche genetiche adatte (ceppo mutante), il quale non deve essere in grado di produrre livelli significativi di un prodotto che va a bloccare la via metabolica che porta al metabolita secondario desiderato.

c. Rimozione dei fenomeni di inibizione o repressione —> intervengo creando un ceppo mutante che sia meno sensibile ai livelli di prodotto che creano meccanismi di inibizione e repressione della via metabolica. (In questo caso è l'organismo che è più resistente e meno sensibile ai livelli di prodotto che normalmente causano repressione e inibizione —> servono livelli di prodotto più alti)

I processi che portano all'accumulo di metaboliti secondari si dividono in 2 fasi: Troofase e Idiofase.

Nella prima si ha la biosintesi dei metaboliti primari e qui si ha lo sviluppo della biomassa cellulare ma non dei metaboliti secondari. Essa finisce con la fase di crescita esponenziale (terza fase).

L'Idiofase è la fase in cui si ha l'arresto cellulare e la sintesi di metaboliti secondari, ottenuti grazie ad enzimi repressi nella prima fase o grazie all'accumulo di metaboliti primari. Ha inizio nella fase stazionaria (5a fase). Per l'accumulo di metaboliti secondari si deve avere l'arresto dello sviluppo cellulare, tuttavia non sempre esso si traduce come un accumulo di metaboliti secondari, sono necessarie infatti 2 condizioni: utilizzo di un idoneo terreno culturale e l'utilizzo di un microrganismo con caratteristiche genetiche adatte. La presenza di una sola delle 2 condizioni può portare alla sintesi dei metaboliti secondari ma non in quantità significative (le procedure che vedremo si basano per questo su entrambe le condizioni).

Le procedure per l'ottenimento di metaboliti secondari sono di 4 tipi:

a. Induzione —> si crea un ceppo mutante in maniera tale che gli enzimi relativi alla biosintesi dei metaboliti secondari vengano indotti già durante la trofofase. E' fondamentale un ottimo substrato colturale.

b. Regolazione da prodotto finale —> Anche qui si crea un ceppo mutante in modo tale da renderlo meno sensibile ai livelli di quel prodotto finale che mi va ad inibire o reprimere la via metabolica che porta alla formazione del metabolita secondario che voglio (è il corrispondente del b. Per i metaboliti primari).

c. Regolazione da catabolismi —> In alcuni casi la biosintesi di alcuni metaboliti secondari viene inibita da quelle fonti di carbonio rapidamente metabolizzabili come il glucosio attraverso un meccanismo detto repressione cattolica da carbonio. Questa consiste nel fatto che il carbonio va a reprimere la sintesi o inibisce l'attività di un enzima coinvolto nella via metabolica che porta al metabolita secondario secondo quei meccanismi di controllo da feedback visti. Si ricorre all'applicazione di tecnologie al terreno colturale aggiungendo la fonte di glucosio gradualmente nel tempo, impostando la velocità di rifornimento sulla velocità con cui il microrganismo lo consuma: in questo modo la [] non raggiunge mai la soglia oltre la quale si ha questo effetto di repressione o inibizione. Sono stati osservati effetti inibitori simili anche a carico dell'ammoniaca e di altre fonti di N, ma anche a carico del fosforo inorganico che in alte concentrazione può inibire la sintesi dei metaboliti secondari (quando il fosforo inorganico esaurisce si ha il passaggio alla Idiofase e quindi ha inizio la biosintesi dei metaboliti secondari).

d. Sbilanciamento del terreno colturale —> Distinguiamo terreni colturali bilanciati e sbilanciati: i primi sono quei terreni in cui tutti i nutrienti (nutriti) sono presenti nelle giuste proporzioni determinate dalle esigenze nutrizionali del microrganismo utilizzato (in questo caso si ha sviluppo della crescita cellulare); nel secondo alcuni nutrienti sono presenti in eccesso o in difetto rispetto alle esigenze nutrizionali del microrganismo. Se trasferiamo un microrganismo da un terreno bilanciato ad uno sbilanciato si manifestano diverse conseguenze: l'esaurimento del fosforo inorganico porta ad un arresto dello sviluppo cellulare; l'esaurimento del magnesio determina un rallentamento nella sintesi dell'RNA e l'arresto dello sviluppo cellulare; l'esaurimento dell'azoto determina un arresto dello sviluppo cellulare e un accumulo di lipidi e polisaccaridi. Qualunque sia il nutrita il passaggio dal primo terreno al secondo provoca l'arresto cellulare e questo permette lo sviluppo di metaboliti secondari.

PROCEDURE PER OTTENERE NUOVI METABOLITI MICROBICI

Queste si basano sulla ricerca scientifica di questi nuovi metaboliti, quindi sui microrganismi che li producono e si basano sullo sviluppo dei procedimenti per produrli. Possono essere finalizzate alla messa a punto di un nuovo processo (per aumentare la resa o renderlo più economico) o alla scoperta/ottenimento di un nuovo metabolita. Oppure ancora per una modifica innovativa del processo. Qualunque sia la finalità di queste procedure quello che sta alla base di queste è la selezione di un microrganismo produttore, o meglio di un ceppo produttore. Per questa selezione con il termine di screening si identifica una procedura di ricerca e di sviluppo per individuare un microrganismo produttore di una nuova molecola o un alto produttore di una molecola già nota.

Questi screening possono essere suddivisi in due fasi:

• screening primario: ha lo scopo di identificare e caratterizzare un microrganismo produttore

• screening secondario: ha la finalità di mettere a punto il processo (per determinare la resa, i vari parametri in gioco ecc.) con scopo di migliorare la produttività. [questa fase non la vedremo]

SCREENING PRIMARIO

Ciascuno screening è suddiviso in stadi successivi, i quali possono avvenire con un certo ordine oppure senza un ordine preciso. Stadi screening primario (in generale in questo ordine, ma possono essere messi anche diversamente):

1) Raccolta campioni —> ottenere un campione di microrganismi. Come fonte di protisti, oltre alle collezioni ufficiali (che non sono sempre utilizzabili), in natura si considerano in relazione alla biogeografia. Nel caso dei protisti possiamo prendere in considerazione vari tipi di habitat: campioni di terreno, acqua o materiale in decomposizione. Una volta raccolto il campione, questo deve essere trasportato in laboratorio nel tempo più breve possibile e in contenitori termici per evitare uno sbalzo di temperatura sia positivo che negativo. L'importante è che la temperatura venga mantenuta più costante possibile per evitare la morte delle cellule che ci interessano.

2) Isolamento dei ceppi —> questo stadio è preceduto da una procedura che consiste nel sospendere un'aliquota del campione in acqua (dolce o salata a seconda dell'habitat di provenienza). Se è un campione di suolo umido si prendono 1-2g si campione e si sospendono in 10ml di acqua, poi cerchiamo di disperdere eventuali agglomerati tramite agitazione con una bacchetta; questo è importante nel caso in cui le cellule si trovano in interstizi e le vogliamo libere in acqua. In seguito si fa una prima filtrazione del campione con maglie di dimensioni variabili; questa prima filtrazione ha lo scopo di eliminare dal campione tutti i microrganismi di dimensione superiore alla o alle specie di interesse. Sempre in questa procedura preliminare il campione (in acqua) viene sottoposto a una prima osservazione allo stereomicroscopio. A questo punto avviene il vero e proprio isolamento delle cellule: durante l'osservazione allo stereomicroscopio mediante l'utilizzo di micropipette si procede all'isolamento delle singole cellule (con una micropipetta si prende una cellula). È importante prenderne una alla volta perché ognuna darà luogo tramite riproduzione asessuata a un singolo ceppo. Ogni cellula si trova in una singola provetta e si passa al terzo stadio.

3) Allestimento di colture —> le singole cellule prelevate vengono utilizzate per allestire delle minicolture di mantenimento usando dei terreni di coltura universali (a seconda comunque dell'habitat di provenienza) e appropriate condizioni di temperatura, di luce (se autotrofi), di pH, salinità ecc. In questo modo ogni cellula dà origine a dei cloni con riproduzione asessuata. A questo stato non conosciamo ancora a quale specie appartiene la singola cellula, quindi non conosciamo i terreni di coltura appropriati e le condizioni specifiche corrette. Per questo si usano terreni di coltura di universali che permettono almeno qualche divisione e si usano temperature e condizioni simili a quelle dell'habitat di prelievo. Inoltre, una volta che abbiamo ottenuto un centinaio di cellule o più, queste le dividiamo in altre provette e proviamo terreni di coltura diversi per capire quello ottimale.

4) Identificazione e caratterizzazione dei ceppi [lo faremo in lab] —> ogni ceppo ottenuto va identificato e caratterizzato. Ciascuna minicoltura di mantenimento viene suddivisa in due parti: una parte viene sottoposta ad analisi di tipo morfologia e l'altra parte ad analisi di tipo genetica. Entrambe le analisi hanno lo scopo di identificare il ceppo. L'analisi morfologica (identificazione tassonomica) viene fatta con tecnica di QPS (Quantitative Protargol Staining) e si tratta di una colorazione quantitativa con Protargolo (soluzione di un colorante che colora le strutture ciliari, i flagelli e i microtubuli in generale). È una tecnica messa a punto utilizzando i protozoi ciliati, ma può essere estesa a tutte le specie che presentano strutture ciliate. Oltre all'identificazione della specie, o meglio al massimo si arriva al genere, permette di ottenere anche una stima di abbondanza delle cellule nel campione.

Passaggi di questa tecnica:

- il campione viene sottoposto a una seconda filtrazione per filtrare la minicoltura di mantenimento, cioè per ottenere un'unica specie di microrganismi. Questa viene fatta usando un apparato filtrante costituito da una beuta collegata ad una pompa a vuoto; sopra c'è una siringa che sarebbe il contenitore dove viene versata la minicoltura di mantenimento. Alla base della siringa viene posto un filtra di nitrato di cellulosa di diametro di circa 25mm e porosità compresa fra 0,8 e 3 um a seconda della specie da filtrare. Il liquido passa attraverso il filtro sul quale rimangono trattenute le cellule e il filtro si colora di scuro.

- A questo punto il filtro viene rimosso dall'apparato e posto con il residuo verso l'alto sopra un pezzo di vetro scaldato a 50°C per pochi secondi per eliminare l'eccesso di acqua presente sul filtro.

- Si prepara un vetrino coprioggetto sopra al quale si mette una goccia di una soluzione di agar al 2,5% Questo vetrino viene capovolto e posato sopra il filtro dove c'è il residuo cellulare.

- Si applica una leggera pressione sul vetrino spingendolo sul filtro in modo tale da creare un sottile strato di agar fra vetrino e filtro con la funzione di far aderire e imprigionare le cellule tra le maglie del filtro. Si lascia solidificare l'agar per circa 5 minuti.

- Dopo aver fatto solidificare l'agar si tagliano i bordi del filtro che fuoriescono dal vetrino coprioggetto e si toglie il filtro dal vetrino.

- Si mette il filtro dentro una giara, un particolare contenitore con scanalature dove vengono messi i vetrini o i filtri. In questa giara c'è dell'acqua distillata. In seguito si passa in un'altra giara con il fissativo di Bouin che permette di fissare le cellule sul filtro. Infine si passa in un'ultima giara dive c'è il protargolo. Alla fine viene fatto asciugare e osservato al microscopio per identificare le specie almeno fino al grado di genere in base alle strutture microtubuari (in particolare ciglia e flagelli).

L'analisi di tipo genetica si fa sia per avere un riscontro dell'analisi morfologica sia per capire la specie precisa se siamo arrivati solo al genere precedentemente. Il campione viene sottoposto a diverse metodologie che si basano sul DNA. Bisogna selezionare dei marcatori genetici che siano specie specifici, ovvero ogni specie ha una sequenza diversa per questo gene. Si utilizzano diversi marcatori, sia geni nucleari che mitocondriali. In entrambi i casi si possono scegliere sia geni codificanti per proteine sia geni non codificanti. Tra i geni nucleari non codificanti molto utilizzato è quello per l'RNA ribosomale 18s; sempre fra questi molto utilizzati sono anche gli spaziatori interni [ITS]. Questi ultimi vengono anche usati per popolazioni di origine geografica diversa all'interno della stessa specie, infatti vengono usati anche per studi di variabilità intraspecifica perché hanno un tasso di mutazione superiore a quello dei geni per l'RNA ribosomale 18S che è si specifica per ogni specie, ma non varia all'interno di una singola specie.

Questi ITS fanno parte dello stesso cistrone ribosomale in cui è presente il gene per l'RNA 18S. Questo cistrone ribosomale è costituito da unità di trascrizione separate da IGS; ogni unità di trascrizione (nel trascritto primario) vede alle estremità una 5'ETS e una 3'ETS, i tratti che codificano per il tratto ribosomale 18S, per il 5,8S e per il 24S e fra questi tratti i due ITS. Durante la maturazione gli ITS e le estremità vengono rimosse. Il 18S va a costituire la subunità piccola del ribosoma; il 5.8S e il 24S quella grande. Fra i geni nucleari codificanti possono essere utilizzati quelli codificanti per le proteine EF1alpha1 e EF1alpha2 (Elongation Factor); fra quelli mitocondriali tra quelli non codificanti l'RNA ribosomale 16S, mentre fra quelli codificanti il gene per la citocromo B o per la subunità 1 della citocromo ossidasi; quest'ultimo è il gene selezionato per la tecnica del DNA barcoding. Ad ogni specie di organismo vivente corrisponde una sequenza specifica di questo gene. Una volta selezionato il gene da utilizzare va amplificato con la PCR con i primer necessari. Come DNA possiamo utilizzare due alternative: si usa il DNA estratto da una minicoltura di mantenimento (quindi corrisponde ad una singola specie di protisti e sono tutte cellule identiche) oppure si usa il DNA estratto da un'aliquota di acqua del campione subito dopo la prima filtrazione. Qui c'è il DNA di più specie di protisti. Come primer usiamo delle coppie di oligonucleotidi che si trovano all'estremità dei geni che vogliamo amplificare. Questi vengono costruiti in posizioni altamente conservate.

A questo punto facciamo la PCR e i prodotti dell'amplificazione vengono osservati su gel di agarosio tramite corsa elettroforetica. Ogni banda corrisponde a un tratto e corrisponde a un insieme di molecole di dna tutte della stessa dimensione. Se la PCR è stata fatta su una minicoltura di mantenimento le molecole di dna amplificate saranno tutte identiche fra loro, cioè con la stessa sequenza perché la specie è la stessa, a meno che non ci siano casi di polimorfismo genetico (mutazione da qualche parte che la fa assomigliare alla nostra). Se il DNA utilizzato è stato estratto dalla aliquota le molecole amplificate con stessa dimensione hanno sequenza diversa, ognuna delle quali corrisponde a specie diverse. A questo punto: nel primo caso il prodotto di PCR viene sottoposto alla tecnica di sequenziamento diretto di tutte le sequenze (uguali fra loro); se il dna estratto è quello di un'aliquota il sequanziamento ci dà un cromatogramma con picchi diversi che è illeggibile.

In questo secondo caso facciamo clonaggio in batteri: inseriamo le diverse molecole in dei plasmidi circolari, ognuno dei quali viene fatto replicare in una cellula batterica di E. coli e otteniamo un clone batterico ricombinante con all'interno un'unica molecola di DNA amplificata. A questo punto facciamo la sequenza di tutti i cloni ricombinanti usando primer che stanno all'estremità dell'inserto nel plasmide. A questo punto che abbiamo la sequenza andiamo in banca dati è cerchiamo quella più simile alla nostra o anche identica. Se non la troviamo identica vediamo la variabilità all'interno della specie per capire se appartiene a quella specie.

5) Saggi di valutazione di attività —> procedure che vengono utilizzati per vedere se il ceppo che abbiamo trattato presenta una qualche attività interessante dal punto d i vista idustriale; i metodi sono diversi per questi saggi e sono in genere soltanto qualitativi e non quantitativi che sono fatti con tecniche di approfondimento successive. Questi possono essere fatti non solo alla fine, ma già dopo il primo stadio cioè dopo la raccolta di campione, o meglio dopo la prima filtrazione in modo da cercare una cellula che vogliamo noi che produca una sostanza che vogliamo (ci sono dei metodi di colorazione che individuano le cellule che producono quella sostanza). Anticipando questa fase riusciamo a diminuire il numero di ceppi che vengono sottoposti ai passaggi successivi.

VALUTAZIONE DELLO SVILUPPO MICROBICO

Studiamo i vari metodi utilizzati per valutare l'andamento della crescita cellulare. Ciò è importante per costruire la curva di crescita del microrganismo di interesse e conoscere quindi la cinetica; è importante anche perché può esserci la necessità di controllare se si è formato il prodotto che io voglio e di controllare il consumo o la trasformazione dei diversi componenti del terreno colturale.

Questi 2 aspetti del terreno colturale sono conseguenza della crescita cellulare e sono utili per sapere cosa si è trasformato e cosa si è esaurito. Esistono diversi metodi per la valutazione, la quale va fatta in base a criteri che variano a seconda che io operatore voglia un metodo rapido, uno semplice, uno specifico per il microrganismo di interesse, uno preciso o un metodo economico.

Lo sviluppo microbico è dato dal contributo di 2 tipi di accrescimenti e cioè dall'aumento del numero delle cellule (la moltiplicazione cellulare) e dall'aumento delle dimensioni delle singole cellule (crescita cellulare). Questi 2 vengono indicati rispettivamente con i termini di concentrazione cellulare e densità cellulare ed entrambi contribuiscono a dare lo sviluppo microbico. Nei vari metodi che vengono utilizzati raramente si tiene conto di questa distinzione ma si va a valutare l'incremento della biomassa che risulta da questi 2 tipi di accrescimento. I vari metodi devono anche tener conto delle modalità di sviluppo del microrganismo che sto utilizzando: se esso si moltiplica per divisione binaria, per gemmazione ecc. (devo conoscere come il microrganismo aumenta le dimensioni e come si riproduce).

I metodi possono essere:

- DIRETTI —> Le misure vengono fatte in riferimento ai parametri delle cellule stesse (numero cellule, volume, peso o massa).

- INDIRETTI —> Le misure si basano su parametri relativi alla coltura cellulare, per esempio qualche proprietà fisica (come diffusione della luce), qualche proprietà metabolica o qualche costituente cellulare presente in coltura.

METODI DIRETTI

- Se si determina il numero di cellule è possibile farlo grazie a 2 tecniche: microscopica o elettronica.

• La tecnica microscopica utilizza le camere di conta, che sono camere emocitometriche utilizzabili per contare le varie cellule. Una camera di conta presenta un vetrino portaoggetti sulla quale troviamo un reticolo e un vetrino coprioggetto che genera in corrispondenza del reticolo del vetrino portaoggetti uno spazio il cui volume varia in base al vetrino. Si introduce un'aliquota nota di coltura nello spazio tra i 2 vetrini e successivamente si vanno a contare le cellule presenti in ogni quadratino del reticolo (spesso dobbiamo moltiplicare per un fattore di conversione che tiene conto del volume introdotto per capillarità). Possono presentarsi problemi relativi alla mobilità delle cellule e per evitare errori si seguono alcune strategie: una è quella di fissare le cellule per fermarle (può però deformare le cellule e lisarle, oltre ad essere tossico anche per l'operatore), un'altra è quella di utilizzare il freddo per rallentare il movimento delle cellule, un'altra ancora è quella di aggiungere al campione un liquido viscoso come il glicerolo che rende il mezzo acquoso più difficile da attraversare per le cellule che quindi rallentano il loro movimento. Al posto delle camere di conta si possono fare dei prelievi di aliquote note della coltura e contare il numero di cellule; per evitare errori il conteggio viene effettuato da più persone indipendentemente.

• La tecnica elettronica utilizza il Coulter Counter il quale ha un piccolo foro compreso tra 30 e 100 micrometri. All'interno del recipiente si applica il vuoto tramite l'apertura apicale in modo che le cellule passino dalla coltura nel dispositivo. Se si applica una ddp tra l'interno del contenitore dove c'è il vuoto e la coltura tramite due elettrodi questo passaggio di cellule provoca un aumento della resistenza. Si generano così degli impulsi che vengono convertiti in segnali proporzionali al numero di cellule. Questa tecnica risulta più accurata e ha tempi di esecuzioni minori, dandoci informazioni anche sul volume delle cellule.

- Metodi diretti per la valutazione del volume:

Il volume umido delle cellule si stima tramite centrifugazione, ovvero si centrifuga un'aliquota di coltura utilizzando una provetta graduata per un tempo e una velocità precisa a seconda dell'organismo e alla fine prendo il volume del pelle cellulare. Questo metodo è influenzato da fattori che ne limitano l'applicabilità, in particolare dalla variabilità della quantità di acqua inglobata nelle cellule (da qui umido).

- Metodi diretti per la valutazione della massa:

• valutazione del peso umido —> effettuata nello stesso modo della valutazione del volume con centrifugazione, solo che alla fine si determina il peso in grammi del pelle cellulare

• valutazione del peso secco —> come nel primo, ma in questo caso si fa prima un lavaggio e poi viene essiccato a T compresa tra 80-110 °C a pressione ridotta fino a raggiungere un peso costante.

METODI INDIRETTI

Possono basarsi sulla valutazione della torbidità [1], della concentrazione dei componenti cellulari [2], del consumo di substrato [3], della viscosità [4] e dello sviluppo di calore [5]. Tutti questi parametri possono essere associati allo sviluppo microbico.

1) La valutazione della torbidità viene fatta leggendo la densità ottica dell'aliquota della coltura alla lunghezza d'onda di 600 nm, e viene associata allo sviluppo microbico.

2) In questo caso valuto le concentrazioni di alcuni componenti cellulari specifici delle cellule sfruttando la spettroscopia a fluorescenza: alcuni emettono la luce assorbita ad una lunghezza d'onda diversa e ciò essere associato al numero di cellule e quindi allo sviluppo microbico. Ci sono limitazioni rappresentate dal fatto che alcuni componenti cellulari non sono specifici delle sole cellule ma possono derivare anche da residui presenti nel terreno colturale. Altri componenti come DNA,RNA,ATP e NAD sono specifici e non pongono tali problemi.

3) In questo caso vado a misurare le velocità specifiche di consumo del substrato e di formazione del prodotto: esse possono essere associate alla crescita cellulare quando il prodotto che si forma è costituito dalla

biomassa stessa, oppure quando la formazione del prodotto e quindi il consumo del substrato è associta alla crescita cellulare (questo metodo indiretto può quindi essere utilizzato soltanto nei processi di tipo 1).

4) Qui valuto la viscosità di un campione di coltura che può essere associata allo sviluppo miscorbico. La viscosità può variare nel corso del processo microbiologico: diminuisce per effetto della scomparsa dal terreno colturale di un componente viscoso che scompare come conseguenza del metabolismo microbico, oppure aumenta sia perché aumenta il numero di cellule sia per la sintesi di un prodotto viscoso la cui sintesi è associata alla formazione di un prodotto correlato all'aumento della crescita cellulare come avviene nei processi di tipo 1.

5) Si valuta la T presente in un campione di coltura. Sviluppo di calore è associato a tutti i processi microbiologici e questo aumento di T è proporzionale al numero di cellule vitali (che hanno quindi metabolismo e producono calore).

PROCEDURE DI RECUPERO DEI PRODOTTI DI BIOREAZIONE

Le varie procedure di recupero utilizzate sono tante. La scelta è condizionata da alcuni fattori tra cui:

• Concentrazione di prodotto nella coltura rispetto ai nutriti residui non utilizzati

- se il mio prodotto è presente all'interno della coltura a [] inferiore rispetto a quella dei nutriti non utilizzati devo scegliere una procedura di recupero altamente specifica per il prodotto che voglio recuperare.

• Stabilità del prodotto ai diversi parametri della procedura di recupero (T, pH, presenza di solventi ecc) —> Se questi fattori danneggiano il prodotto ovviamente devo utilizzare un'altra procedura con parametri diversi e favorevoli.

• Costi, che in alcuni casi condizionano lo sviluppo industriale di un prodotto.

Le diverse procedure di recupero si dividono in 2 fasi principali:

1) FASE DI SEPARAZIONE DELLE CELLULE

Consiste nella separazione della fase solida dalla fase liquida (della biomassa dal filtrato colturale che rimane all'interno del bioreattore). Questa fase può essere fatta con procedure diverse a seconda del tipo di microrganismo e in maniera particolare a seconda delle dimensioni e dell'aspetto morfologico delle cellule (se si tratta di un unicellulare, colonia, cenocita ecc). Un altro fattore da tenere i considerazione è la viscosità della brodocoltura.

Le procedure della prima fase possono essere:

• Sedimentazione spontanea —> consiste nella sedimentazione spontanea delle cellule alla base del bioreattore; è molto economica e naturale ma ha dei limiti, infatti bisogna tenere conto che le cellule microbiche con dimensione compresa tra 1 e 10 micrometri presentano una bassa velocità di sedimentazione

• Flocculazione —> è basata sulla formazione di aggregati cellulari chiamati flocculi. Il vantaggio è che questi aggregati presenta una velocità di sedimentazione maggiore rispetto alle singole cellule ed inoltre risultano più facilmente filtrabili nella seconda fase. (si usa per cellule inferiori a 10 micrometri). Posso favorire la formazione dei flocculi modificando il pH della brodocoltura o aggiungendo un elettrolita o di un polimero nella brodocoltura.

• Flottazione —> E' inversa rispetto alle prime 2 nel senso del verso che prendono le cellule nel bioreattore, infatti le cellule vanno verso l'alto. Viene favorita dall'immissione di aria nella brodocoltura: le cellule rimangono assorbite sulla superficie delle bolle d'aria che vengono introdotte alla base del bioreattore (grazie

allo sparger che divide l'aria in tante bolle); queste bolle catturano le cellule e risalgono verso l'alto dove le cellule rimangono intrappolate nella schiuma che viene poi rimossa dalla superficie della brodocoltura. Può essere favorita dall'aggiunta di ammine e acidi grassi, favorendo l'adesione tra bolle e cellule.

• Centrifugazione —> Come la prima si basa sulla sedimentazione, in questo caso però ovviamente non spontanea. Ci sono vari dispositivi impiegati per la centrifugazione che vanno scelte in base alla dimensione delle cellule e alla viscosità della brodocoltura:

-Decanter E' un dispositivo cilindrico ad asse orizzontale. Abbiamo un cilindro esterno e una parte interna detta coclea a struttura elicoidale che ruota ad una velocità diversa rispetto al cilindro esterno: questo fatto permette la separazione e l'uscita da una parte dei solidi e dall'altra dei liquidi

-Centrifughe multicamere Sono dei dispositivi in cui la brodocoltura viene introdotta dall'alto al centro del canale di apertura. Dopo si ha la deposizione progressiva delle cellule microbiche sulle pareti delle camere che sono presenti nella centrifuga; alla fine l'uscita avviene all'esterno del canale di entrata.

- Centrifughe a piatti

Simile a quella multicamera ma la brodocoltura passa attraverso dei dischi (piatti) sulla cui superficie si ha la sedimentazione progressiva delle cellule microbiche. L'uscita avviene nello stesso modo di quella a camere ma in queste a piatti possono esserci dispositivi per lo scarico automatico dei solidi.

-Centrifughe tubolari o cilindriche

Si tratta di dispositivi cilindrici ad asse verticale con immissione di brodocoltura dal basso. Le cellule aderiscono alle superfici interne mentre il filtrato colturale esce dall'alto

• Filtrazione —> Si basa su gravità e azione meccanica. Vengono utilizzati dei filtri che possono essere di superficie o di profondità a seconda della loro posizione nell'apparato filtrante e possono essere in cellulosa, lana di vetro ecc (tutti però molto costosi). Bisogna considerare l'aumento della comprimibilità della fase solida da una parte del filtro e la diminuzione della permeabilità della fase liquida nel lato opposto: per evitare questo e mantenere il filtro attivo si utilizzano particolari sostanze dette coadiuvanti della filtrazione (farina fossile o diatomite, celite o allumato tricalcico).

I principali dispositivi sono il filtro ruotante sottovuoto (dispositivo cilindrico ad asse verticale con al centro un tamburo ruotante sottovuoto, sulla cui superficie si trova il filtro. Man mano che il tamburo ruota le cellule vengono aspirate e trattenute nel filtro favorendo disidratazione, lavaggio, 2a disidratazione e rimozione del film cellulare) e filtro pressa (la coltura viene pressata sul filtro e le cellule per azione meccanica rimangono nel filtro).

2) FASE DI ISOLAMENTO DEL PRODOTTO

Se il mio prodotto sono le cellule ho finito già con la prima fase, se però il mio prodotto è un metabolita prodotto dalle cellule devo capire se si tratta di un metabolita intra o extracellulare: nel primo caso si trova nella fase solida, nel secondo nella fase liquida. I metaboliti extracellulari possono essere prodotti dal metabolismo primario (acido lattico..), dal secondario o per biotrasformazione.

I metaboliti intracellulari possono essere enzimi, acidi nucleici ecc. Per omogeneizzare il tutto e avere il prodotto nella fase liquida devo rompere le cellule (fase di rottura delle cellule) prima di questa fase. Ciò può avvenire tramite:

- metodi fisici e meccanici, come gli ultrasuoni, la macinazione, congelamento, disidratazione e pressa/mulino
- Metodi biologici, come il trattamento con enzimi, autosili e trattamento con antibiotici

- Metodi chimici, come estrazione con solventi, trattamento con detergenti, trattamento con acidi o basi e shock osmotico.

A questo punto la seconda fase avviene sulla fase liquida e si può suddividere in 2 sottofasi:

- fase recupero del prodotto —> può avvenire in 3 modi diversi: per estrazione (si ha il passaggio del metabolita che voglio dalla fase liquida, grazie ad un solvente estraente), per concentrazione (si riduce il volume della fase liquida o per evaporazione o per ultrafiltrazione) o per frazionamento (si ha la separazione della frazione contenente il metabolita desiderato e l'eliminazione di sostanze estranee. Ciò può verificarsi grazie a cromatografia o alla tecnica di precipitazione frazionaria).

- fase di purificazione del prodotto —> consiste nell'eliminare le sostanze estranee e le impurezze presenti nel prodotto (fino al grado di purezza desiderato dall'operatore). Ciò è possibile grazie a varie tecniche che dipendono anche dal tipo di prodotto.

PROTISTI COME BIOINDICATORI

Oggi vediamo l'utilizzo dei protisti come bioindicatori della qualità dello stato di salute degli ambienti naturali. Per avere informazioni sullo stato di salute di un ambiente generalmente si va sul posto e si misurano le concentrazioni degli inquinanti (METODO CHIMICO). Questo metodo fornisce risultati rapidi e precisi, ma ha lo svantaggio di non poter valutare gli effetti che gli inquinanti hanno sugli organismi viventi; per questo motivo si affianca il METODO BIOLOGICO, che sfrutta organismi viventi come indicatori dello stato di salute di un ambiente. Attualmente ogni habitat può essere controllato grazie a bioindicatori: le acque dolci vengono analizzate grazie a piccoli crostacei; le acque marine grazie ad anelli di policheti; per gli ambienti terresti si utilizzano i licheni. Alcuni anni fa alcuni ricercatori hanno proposto l'utilizzo dei protisti come bioindicatori per gli ambienti naturali. I protisti vivono infatti ovunque ci sia presenza di acqua (è il fattore limitante) e possono essere utilizzati come bioindicatori quindi per ogni habitat o ambiente. Altri ricercatori li hanno anche proposti come bioindicatori dell'aria degli ambienti cittadini.

I vantaggi di utilizzare protisti come bioindicatori sono diversi:

- Si riproducono a ciclo continuo —> dopo circa 4 o 6 ore da una cellula abbiamo 2 cellule per riproduzione asessuale; dopo 8 ore ne abbiamo 4 ecc. Ciò permette di valutare se gli stress ambientali hanno un effetto non solo nella popolazione presente in quel momento in quell'habitat, ma anche sulle generazioni future (se quindi si hanno modificazioni genetiche e non solo somatiche).

- Reagiscono immediatamente agli agenti perturbatori e altrettanto rapidamente si adeguano alle condizioni ristabilite —> Essendo i protisti unicellulari, sono separati dall'ambiente e quindi dall'inquinante soltanto dall'involucro esterno (tunica ecc) e non si ha quindi intermediazione, cioè il passaggio di un segnale attraverso i tessuti (reagiscono immediatamente).

- Mostrano un'ampia gamma di risposte diverse ai diversi fattori ambientali —> Alcune specie reagiscono in maniera specifica ad alcuni stress ambientali. Nell'ambito dei protisti i protozoi ciliati hanno un vantaggio in più dal punto di vista applicativo e metodologico: sono più facilmente riconoscibili in vivo per la presenza delle ciglia stesse.

Essi vengono utilizzati per il controllo degli impianti di depurazione delle acque refluee (sia civili che industriali) per 2 motivi: 1) si cibano di batteri e ne mantengono la popolazione sotto controllo (i quali degradano le sostanze organiche dei liquami); 2) un altro vantaggio è che man mano che avviene la depurazione compaiono nuove specie diverse e quindi l'analisi di quale specie è presente in un dato momento mi permette di valutare lo stato di efficienza dell'impianto. Alcuni esempi di protisti utilizzati qui sono gli Euplotes e le Vorticelle.

UTILIZZO DEI PROTISTI COME BIOINDICATORI NEGLI AMBIENTI ACQUATICI

Questo fenomeno detto fioritura o Bloom algale è dovuto alla presenza di alcuni protisti. Si verificano in alcuni periodi dell'anno in seguito a certe condizioni ambientali, come un aumento della T dell'acqua e un'atrofizzazione dell'acqua, cioè la presenza di inquinanti contenenti macroelementi (N,P). Consiste in una proliferazione eccessiva di cellule di una specie di Protista di natura algale. Nella maggior parte dei casi portano solo una colorazione intensa dell'acqua, il cui colore dipende dai pigmenti presenti nelle cellule della specie che sta dando vita ad una fioritura algale. In altri casi, quando ad esempio sono presenti dei dinoflagellati, alcune specie possono produrre sostanze tossiche per gli altri animali.

Un fenomeno importante è quello che ha riguardato il Lago di Tovel, in provincia di Trento, diventato famoso poiché d'estate in una zona l'acqua diventava di colore rosso. Il responsabile era un dinoflagellato chiamato Tovella sanguinea (ha pigmenti caretenoidei di colore rosso). In realtà erano 3 specie morfologicamente identiche ma geneticamente diverse, tutte presenti ma con esigenze ecologiche diverse: soltanto 1 ha al suo interno pigmenti rossi, le altre 2 specie non li avevano e queste ultime erano aumentate al contrario di quelle con i pigmenti rossi.

Nel 2004 sul lago di Garda ci fu una fioritura algale di Stentus amethystinus, il quale aveva dei pigmenti neri che coloravano l'acqua di nero. Questa specie si ritrovava in un lago austriaco e uno tedesco. Probabilmente era stato portato a Garda da qualche turista e non avendo trovato competizione o predatori poteva nutrirsi quanto necessitava. Dopo qualche giorno i predatori sono aumentati e hanno riportato la popolazione all'equilibrio.

Lago Hiller (Australia) —> lago ipersalino la cui colorazione è dovuta a Dunaliella salina: quando concentrazione salina è bassa ha colore verde, quando la concentrazione salina aumenta diventa rossa/rosa.

CONTRIBUTO DEGLI ORGANISMI VIVENTI NELL'AMBIENTE SUOLO

Nel suolo è presente umidità. Se si considerano la respirazione del suolo, il 91% è dovuta alla componente autotrofa cioè alla microflora di natura algale; il 9% è dovuta alla componente eterotrofa (componente animale). Se consideriamo solo la biomassa di questo 9% il 31% è costituito dagli artropodi, il 38% da vermi e il 31% restante da protisti. Se consideriamo come contribuiscono a questo 9% della respirazione: artropodi per il 16%, vermi per il 15% e protisti per il 69%.

I protisti svolgono anche il ruolo di regolare lo sviluppo delle popolazioni batteriche in quanto si cibano di esse: favoriscono così la presenza di nutrienti nel suolo e la conseguente crescita delle piante. Limitandoci ai protozoi del suolo, abbiamo diversi fattori che influenzano la vita e l'adattamento dei protozoi al suolo:

• Disponibilità d'acqua —> i protozoi utilizzano l'acqua per tutte le loro azioni vitali e rappresenta un'interfaccia con l'ambiente esterno in cui il protozoo vive, oltre che ad essere il principale fattore limitante.

• Variazioni di T —> i protozoi del suolo presentano uno sviluppo ottimale in lab soltanto a valori di T molto vicini alla T dell'ambiente di provenienza.

• Livelli di CO_2, sia nell'acqua che nell'aria —> i protozoi del suolo tollerano diverse concentrazioni di questo composto.

Questi 3 fattori influenzano oltre che la vita anche la riproduzione di questi protozoi del suolo, che possono essere suddivisi in base alle strategie riproduttive in:

- Organismi r-selezionati: flagellati, amebe senza guscio (atecate) e maggior parte dei ciliati —> si riproducono molto velocemente e si disperdono facilmente negli ecosistemi "giovani", cioè soggetti a frequenti modifiche dei parametri ambientali.

- Organismi k-selezionati: testacei (amebe con guscio) e ciliati di grosse dimensioni —> hanno tassi di riproduzione più lenti e sono più adatti agli ecosistemi vecchi.

Le principali differenze tra protozoi del suolo e protozoi acquatici sono:

1) Alcune modificazioni morfologiche: quelli del suolo sono rappresentati da una generale riduzione delle dimensioni e da un allungamento e assottigliamento della cellula. Questo cambiamento consente il movimento in spazi stretti del terreno. La zona orale in particolare è molto diversa: nei protozoi del suolo essa è molto più ridotta e si ha una specializzazione nella scelta del cibo/nutrienti.

2) Tigmotattismo: consiste nella capacità di muoversi con agilità sui substrati del terreno (i natanti non hanno tale capacità)

3) Formazione di cisti di resistenza: usata come risposta dai protozoi del suolo quando l'acqua scende sotto un valore soglia che dipende da specie a specie. Una volta che l'acqua aumenta si ha il fenomeno dell' ex-cistamento.

PROTISTI COME BIOINDICATORI DELL'ARIA

Uno studio di 25 anni studiò le popolazioni di protisti ciliati nei muschi presenti a Pisa. I dati sono stati messi a confronto poi con la quantità di piombo presente nel muschio, concludendo che anche il traffico influenza le popolazioni di protozoi ciliati presenti nel muschio (anche essi danno quindi informazioni sulla qualità dell'aria). Studiarono 5 zone diverse di Pisa e una fuori Pisa incontaminata come zona di controllo. Ogni mese, per 7 mesi, veniva prelevato il muschio in queste stazioni e ogni campione veniva portato in laboratorio e immerso in acqua dolce liberando i protozoi per poi poterli isolare e classificare in base alla morfologia. In seguito si contavano le cellule per ciascuna specie e per ogni campione di muschio si determinava la quantità di piombo utilizzando uno spettrometro ad assorbimento nucleare. Si classificarono 29 specie di ciliati nel muschio.

PROCESSI A FANGHI ATTIVI

A differenza dell'utilizzo dei protesti come bioindicatori che era un'applicazione ambientale, questa è un'applicazione industriale. Si tratta di un processo di depurazione biologica delle acque reflue civili e industriali. Questo processo consiste nella formazione di aggregati batterici chiamati "fiocchi di fango", che sono quelli che degradano le sostanze organiche presenti nei liquami. Su questi aggregati batterici si sviluppano nei liquami altri microorganismi di natura eucariotica unicellulari (protisti) e pluricellulari.

Un processo a fanghi attivi può essere considerato un ecosistema artificiale che ha una sua particolare struttura, la quale si divide in:

-Componenti abiotiche: struttura tecnologica dell'impianto.

-Componenti bioetiche: decompositori, consumatori (ciliati protozoi ecc).

-Fattori abiotici: fisici (clima, T, luce ecc), chimici (natura del liquame, O2 disciolto), alimentari (qualità e quantità di cibo).

-Fattori bioetici: relazione intra e interspecifiche (competizione, predazione).

Considerando i protisti e i ciliati in particolare, troviamo una loro densità di 10.000 cellule/ml^2. I protozoi ciliati che ritroviamo si dividono in base al loro ruolo trofico in 2 gruppi:

- CARNIVORI (si nutrono di altri protisti)

- BATTERIOFAGI Questi ultimi si dividono a loro volta, in base alla modalità di attività predatoria, in 3 gruppi:

- Natanti—>nuotano nella fase liquida dei liquami e si nutrono dei batteri che non sono aggregati. Rimangono in sospensione anche nella vasca di sedimentazione dove avviene la sedimentazione dei fiocchi di fango. –

Mobili di fondo—> si nutrono dei batteri che costituiscono i fiocchi di fango stessi e precipitano.

- Sessili —> sono attaccati grazie ad un peduncolo ai fiocchi di fango e anche essi precipitano nella vasca di sedimentazione.

I natanti e i sessili competono tra loro per i batteri che sono liberi (non aggregati), creando correnti ciliari nel liquame, le quali incanalano i batteri verso la loro regione orale. I mobili di fondo invece si nutrono dei batteri che fanno parte del fiocco di fango, creando anche essi delle correnti ciliari.

Andiamo a vedere la successione delle popolazione nei processi a fanghi attivi, distinguendo 3 fasi:

1) FASE DI COLONIZZAZIONE ==> caratterizzata da specie tipiche dai liquami ancora da trattare (specie pioniere). Queste sono costituite da protozoi flagellati natanti e compaiono indipendentemente dalla formazione dei fiocchi di fango.

2) FASE DI INNESCO ==> caratterizzata dalla formazione dei fiocchi di fango, i quali sono aggregati batterici misti a materiali organici. Si ha anche la diversificazione della struttura delle specie, la quale varia molto in base alla quantità dei fiocchi presenti. All'inizio della fase quando i fiocchi sono pochi abbiamo protozoi ciliati natanti e scompaiono i flagellati; man mano che si va avanti scompaiono i natanti e compaiono gli altri 2 tipi di batteriofagi.

3) FASE DI STABILIZZAZIONE ==> caratterizzata dalla presenza esclusiva dei sessili e dei mobili di fondo.

Un efficiente processo a fanghi attivi:

• Alla fine non dovrebbe avere piccoli flagellati e ciliati natanti (in tal caso c'è un problema di depurazione). La struttura in specie rappresenta un valido indicatore sullo stato di funzionalità di un impianto.

• Dovrebbe aver un' alta densità della microfauna (>= 1 milione di organismi/ L)

• Microfauna composta principalmente da forme mobili di fondo e sessili, con flagellati assenti

• Comunità altamente diversificata, dove nessun(a specie prevale?)

Se queste caratteristiche non si verificano andiamo a vedere il gruppo maggiormente presente nell'impianto e da qui possiamo andare a capire le cause del malfunzionamento dell'impianto. Il parametro che viene utilizzato per valutare la qualità biologica di un impianto è il cosiddetto "INDICE BIOTICO DEL FANGO" (SBI —> Sludge Biotic Index) ed è un valore numerico oggettivo. Questo indice si calcola facendo un'analisi microscopica della microfauna, cioè identificando le specie e stimando quanto numerose sono le specie. Per fare ciò bisogna completare l'analisi entro un tempo limitato dal campionamento (+- 5 ore dal campionamento); un altro accorgimento è quello di utilizzare per l'identificazione dei piccoli volumi di liquame (50-100 uL); altro consiglio è di considerare le specie di cui sono stati visti almeno 2 cellule.

Il conteggio degli individui deve essere suddivisa in 2 tipi:

-Stima delle densità esclusi flagellati: utilizzo volumi molto piccoli di liquame (25 uL); per evitare l'evaporazione del campione utilizzo coprioggetti; utilizzo un ingrandimento piccolo di 100x (10x e 10x) per avere un campo visivo più grande per contare. Per evitare errori suddivido idealmente il vetrino in fasce verticali e contando le cellule partendo da un'estremità all'altra seguendo un percorso a serpentina.

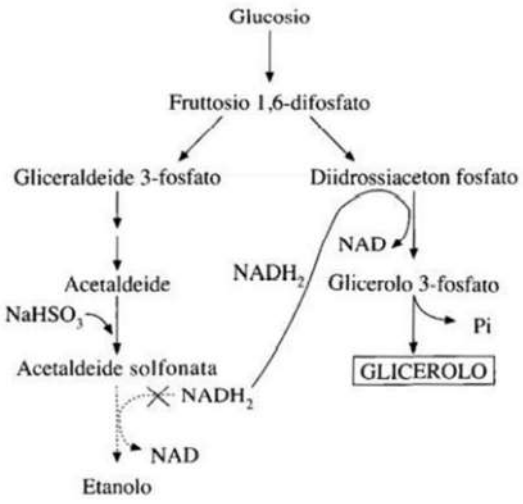
- Stima della densità dei piccoli flagellati: vengono contati a parte per le loro piccole dimensioni e perché sono numerose. Per contarli si utilizza una camera di Fuchs-Rosenthal: è un quadrato di 4 mm profonda 0.2 mm e costituita da 256 quadratini (16x16); si mettono 3,2 uL di campione al centro della camera e poi si

vanno a contare le cellule che sono presenti nei 16 quadrati che costituiscono una delle 2 diagonali delle camera. In seguito si calcola SBI, utilizzando una tabella fissa a 2 entrate: quella orizzontale è data inizialmente dal gruppo dominante; quella verticale è data dal numero totale delle specie e ha 4 ingressi. Più è grande il BSI maggiore è l'efficienza dell'impianto. Questo indice si divide in 4 classi, ad ognuna delle quali corrisponde un giudizio.

PRODOTTI NATURALI DA DUNALIELLA SALINA

E' una microalga verde unicellulare ed è un organismo fotosintetico alofilo, cioè è in grado di vivere in acque ad alte concentrazioni saline (come nel lago australiano della lez precedente). Ha forma ellittico cilindrica con un apice anteriore acuto che si assottiglia e un apice posteriore arrotondato. E' lunga circa 8-9 um e larga circa 6-7 um. In condizioni ottimali si riproduce per via asessuale mediante divisioni binarie longitudinali. All'estremità anteriore possiede 2 flagelli con stessa lunghezza di 10-13 um deputati al movimento dell'organismo. Dunaniella salina viene studiata e coltivata per la sua capacità di accumulare intracellularmente grandi quantità di molecole bioreattive, tra cui glicerolo e carotenoidi (in particolare Beta-carotene). Le vasche in cui viene coltivata sono all'aria aperta e presentano una caratteristica colorazione rossa. Il fatto di essere un microrganismo alofilo fa sì che le coltivazioni siano facilmente gestibili, permettendo la vita solo a questa microalga; inoltre le vasche sono libere da competitori per le condizioni estreme in cui l'alga vive. La coltivazione è molto diffusa in Australia, Israele e USA.

GLICEROLO: Viene utilizzato nel settore medico, alimentare e chimico compreso in quest'ultimo anche quello relativo alla produzione di materiale esplosivo. La sua produzione è aumentata durante le 2 guerre mondiale. Inizialmente il glicerolo era ottenuto dai lieviti e in maniera particolare da saccaromyces cerevisiae.



Qui possiamo vedere la via metabolica che porta al glicerolo: Anche se le quantità erano basse la richiesta del mercato era alta, quindi era conveniente produrre il glicerolo. Attualmente la produzione tramite fermentazione alcolica è stata abbandonata perché non economica (era un prodotto secondario), quindi veniva effettuato un blocco metabolico, in particolare all'acetaldeide solforata all'etanolo impedendo il passaggio degli elettroni, mandandoli all'altra via metabolica. Il blocco metabolico non era totale, quindi oltre a glicerolo si aveva anche etanolo, quindi il recupero del prodotto richiedeva dei costi aggiuntivi per eliminare l'etanolo in quanto indesiderato. Alternativamente il glicerolo si può ottenere con D.Salina.

Per produrre anche i carotenoidi da questa microalga si utilizza un processo israeliano. Questo processo si basa sul fatto che, essendo la microalga in grado di vivere ad alta concentrazione salina, questa produce il glicerolo come un soluto intracellulare in grado di bilanciare la pressione osmotica all'esterno (+ è salata l'acqua all'esterno e più si ha accumulo di glicerolo intracellularmente).

Le condizioni necessarie per il processo sono: • Luce solare • CO2 • Nitrato • Fosfato • pH tra 7-9 • T tra 10-40 °C (T ottimale di 30 °C) • Concentrazione ottimale di NaCl: 1,5 M (se voglio uno sviluppo cellulare) ; 4 M (se voglio produzione di glicerolo). Spesso si usano sali commerciali o acqua di mare sterilizzata.

Questo processo è organizzato in 3 fasi:

1)Nella prima fase la coltura di D. Salina viene allestita in una vasca a cielo aperto profonda circa 30 cm. In questa vasca la concentrazione di NaCl è di 1,5 M che produce un rapido sviluppo cellulare. Il contenuto intracellulare di glicerolo è il 12%.

2) Nella seconda fase la coltura viene trasferita in un'altra vasca, ma con volume ridotto di 1/3 rispetto a quello della vasca precedente. In questa seconda vasca la concentrazione di NaCl viene portata a 4 M, non si ha più quindi sviluppo cellulare ma si ha accumulo significativo intracellulare di glicerolo (può passare anche al 25%).

3) Nella terza e ultima fase si ha il recupero del prodotto/prodotti. Si ha prima la separazione della fase solida da quella liquida o filtrato colturale che avviene trasferendo la coltura dalla seconda vasca ad una terza vasca chiusa a forma di cuneo detta "vasca di sedimentazione", in cui le cellule di D.Salina sedimentano e finiscono nella parte incuneata per essere raccolte. Queste cellule però non sedimentano spontaneamente perché sono piccole, si usa quindi la flocculazione che forma delle aggregazioni, le quali sedimentano più velocemente. Uno dei due fattori per favorire la flocculazione è una modifica del pH oppure l'aggiunta di un elettrolita nel terreno che varia pH. Il terreno colturale viene trasferito in un'altra vasca (la quarta) a forma di cuneo chiusa, in cui si fa evaporare il liquido molto ricco di NaCl, il quale viene riutilizzato per altri processi. Nella fase solida troviamo i nostri prodotti, che sono però metaboliti intracellulari, quindi abbiamo bisogno della lisi delle cellule. Ciò è reso possibile tramite l'utilizzo di etanolo, ma in questo caso c'è bisogno di un costo aggiuntivo per separare etanolo dai prodotti naturali; oppure si fa per shock osmotico, ovvero si pongono in acqua e si fanno scoppiare le cellule per osmolisi, con il rilascio di glicerolo e carotenoidi.

Un altro argomento che possiamo richiamare è la classificazione dei processi microbiologici su base cinetica. Questo processo rientra nel secondo tipo.

CAROTENOIDI: Il beta-carotene viene utilizzato come integratore dietetico e come colorante. Inizialmente lo sviluppo di questo processo è stato motivato per il fatto che il consumatore preferisce un prodotto di origine naturale e non sintetica. Questo interesse si è sviluppato anche dopo la scoperta che da D. Salina si potessero ottenere anche altri tipi di carotenoidi tra cui alfa-carotene, cis e trans beta-carotene, luteina ecc. La separazione dei diversi tipi di carotenoidi avviene grazie a HPLC in colonna.

SISTEMI DI COLTURE DI PROTISTI

Protisti parassiti e protisti a vita libera. Solo quest'ultimi sono nei laboratori in esame. Intento laboratorio: mantenimento e incremento di una collezione di protisti. Una collezione è qualcosa di dinamico: ci sono ceppi che muoiono e altri che arrivano. Altro intento è allestire colture massive. Nell'allestimento delle colture massive ci interessa avere un gran numero di cellule, mentre nel mantenimento di una collezione ci interessa soprattutto che le cellule rimangano vitali per molto tempo. Una collezione di protisti significa mettere insieme dei protisti con certe logiche.

Come si fa e come si incrementa una collezione? Comprare certi ceppi (CCAP; ATCC sono due società che vendono varie specie e ceppi di protisti). Primo aspetto: fare dei campionamenti. I protisti sono cosmopoliti e ubiquitari, ovvero si trovano in qualunque parte del mondo e in qualunque ambiente (ubiquitari). Ubiquitari non lo sono proprio del tutto perché l'acqua deve essere presente per avere dei protisti in quel luogo. Ambienti dai quali si posso prelevare protisti: laghi, mari, stagni, in qualsiasi ambiente umido.

Vediamo i campionamenti da terreno umido (terriccio): Piccoli porzionamenti di terreno umido con utensile che prelevi aliquote fisse e poi si aggiunge (nel contenitore) acqua, si agita per rendere il terreno in forma di polvere; infine si trasporta in laboratorio. Più produttivi sono i campionamenti in acqua, ad esempio in mare: i protisti eterotrofi mangiano protisti autotrofi o batteri. Si campiona sul sedimento perché qui c'è la maggior quantità di materiale organico, quindi grande quantità di batteri che degradano materiale organico. Il campionamento sul fondo si fa prelevando un piccolo strato in senso parallelo al terreno ottenendo sia uno

strato di sedimento che di acqua. Per quanto riguarda i protisti autotrofi è più difficile prelevarli, in particolare per le le quantità perché sono molto più distribuiti nella colonna d'acqua.

Nella colonna d'acqua i protisti si campionano cercando di riprodurre le condizioni del fondale, ovvero facendoci crescere dei batteri: si costruiscono delle trappole in cui ci sono delle esce organiche dove possono crescere dei batteri che le degradano e si concentreranno dei protisti che vanno ad alimentarsi dei batteri. Dopo un po' di tempo si va a prelevare l'esca, si lava con acqua di mare (se prelievo è dal mare) e si analizza questa acqua dove sono rimasti i protisti.

Quando si fa un campionamento bisogna annotarsi 4 cose: • riferimento geografico (coordinate geografiche o nome luogo) • temperatura • salinità (mediamente il mare è 30 per mille); si misura con rifrattometro • pH

Il campione va portato in laboratorio prima possibile mantenendo le condizioni del prelevamento. La prima cosa che si fa in lab è l'osservazione allo stereomicroscopio su una piastra Petri. Con una pipetta Pasteur si isola ogni singola cellula ponendone una per ogni depressione di un particolare vetrino dove in ognuna ci sarà terreno di coltura per farle riprodurre. Come si isolano queste cellule? Fattori da tenere in considerazione: Per quanto riguarda gli autotrofi → mezzo di coltura; temperatura; luce eterotrofi → mezzo di coltura; temperatura; disponibilità di cibo.

Mezzo di coltura: il mantenimento della collezione deve nei limiti del possibile prevedere una riproduzione del mezzo di coltura originario (per questo importante sapere salinità, temperatura e pH). Ci sono mezzi di coltura naturali e artificiali: i primi significa che sono prelevati dal luogo di origine (si preleva ad esempio acqua di mare dove si è fatto campionamento); i secondi sono invece prodotti in laboratorio. A Pisa si usano soprattutto terreni artificiali. Lo svantaggio principale è il fatto che il mezzo naturale non è detto che sia sempre lo stesso quando si preleva. È una variabilità che per gli esperimenti possono creare problematiche. Quelli artificiali sono fatti sempre allo stesso modo se si segue un certo protocollo.

Terreni artificiali si dividono in definiti e indefiniti: i secondi vengono fatti in maniera empirica (esempio estratto di lattuga o frumento essiccato) e non si sa la composizione precisa; quelli definiti hanno invece una componente precisa. Di questi se ne utilizzano prevalentemente 4, due per gli autotrofi e due per gli eterotrofi. I protisti marini autotrofi sono estremamente poco esigenti e per coltivarli si utilizza il protocollo Allen's formula. Quelli marini eterotrofi sono più esigenti: sali che si utilizzano per l'acquario e sono ricchi di oligoelementi (Red Sea Salt). Autotrofi di acqua dolce: SMC. Eterotrofi di acqua dolce: acqua minerale commerciale, in particolare la San Benedetto. Questi terreni devono essere sterili, perché nelle nostre colture dobbiamo avere solo il protista che stiamo analizzando. Per la sterelizzazione usiamo agenti fisici: ci sono quelli meccanici come dei filtri (con maglie molto strette 0,2um) nel quale ci si fa passare il liquido e quando esce è sterile. Inoltre si può usare calore, che può essere vivo, secco e umido. Quello secco sarebbero delle stufe, mentre quello umido è o acqua bollente o vapore fluente (evaporazione acqua che investe il materiale da sterilizzare su un piano).

Temperatura mantenimento: 6°C → ceppi provenienti da polo nord e sud 19°C → altre provenienze

Temperatura accrescimento per le colture massive: - per le prime 6°C (o qualche grado in più) - per le seconde 23°C [i protisti invecchiano non in base all'età anagrafica ma in base al numero di divisioni cellulari; limitando il numero di divisioni si allunga la vita e questi 4°C sono molto importanti per far partire la divisioni]

Luce: in laboratorio si fa con dei neon che hanno doppia componente, una bianca e una rosa (si usano anche nelle serre). Si tengono 12h di luce e 12h di buio.

Disponibilità di cibo: differenza a seconda che sia mantenimento o colture massive, infatti nelle seconde un giorno sì e un giorno no si fa cibatura. Nel primo caso invece ogni 25gg, anche perché metabolismo è ridotto, ovvero divisione cellulare è rallentata. Si usano batteri o alghe unicellulari. Per eterotrofi come cibo si utilizza Dunaliella tertiolecta. Per le specie di acqua dolce si utilizza Chlorogonium elongatum.

Dove si tengono le colture? […]

PRODOTTI NATURALI ISOLATI DA PROTISTI CILIATI MARINI

Attualmente il successo del settore della chimica dei prodotti naturali dipende sempre più da una ricerca multidisciplinare, il quale risulta concretamente vero nel caso di prodotti naturali isolati da microrganismi, in quanto ad eccezione di sporadiche fioriture algali c'è bisogno di un microbiologo che fornisca la coltura del microrganismo produttore, ma anche di un farmacologo e altre figure. I prodotti naturali sono generalmente costituiti da metaboliti secondari, cioè composti chimici che per definizione non sono coinvolti nel metabolismo primario, e non sono essenziali per la vita e la riproduzione delle cellule. Differiscono da proteine e acidi nucleici, che sono coinvolti nel metabolismo primario. La maggior parte dei metaboliti secondari è specie-specifica (specifica di un singolo gruppo di organismi filogeneticamente correlati), inoltre ciò presuppone che in natura ci sia una grande variabilità di questi metaboliti secondari, i quali hanno anche un ruolo adattativo per le specie che li producono: sono quindi soggetti a variabilità in risposta alla pressione selettiva operata dall'ambiente. Molti di questi metaboliti secondari trovano anche impieghi biotecnologici nel campo biomedico, agricolo, nell'acquacoltura e in industrie chimiche-farmaceutiche. Molti metaboliti secondari sono stati estratti da Diatomee e Dinoflagellati, in particolare nei Ciliati i metaboliti secondari più studiati sono stati isolati da:

-Stentor —> comprende specie di acqua dolce da cui è stata estratta la stentorina.

-Blepharisma —> comprende specie sia marine sia di acqua dolce. Dal Blepharisma Japonicum è stata isolata la blepharismina C.

-Pseudokeronopsis —>Dal S. Rubra sono stati isolati la keronopsamide A e la keronopsina A1;

-genere Climacostomum (marine, acqua dolce e salmastre) —> in particolare dalla specie Virens è stato isolato il metabolita climacostosol.

Anche Euplotes si sono mostrati come ottime fonti di metaboliti secondari. Lo studio di quest'ultimi oltre ad avere importanti applicazioni biotech, hanno permesso di aggiungere una nuova dimensione al problema dell'identificazione delle specie in protistologia grazie all'approccio chemio-tassonomico. Prima in letteratura era riportato che ceppi diversi di una stessa morfospecie producevano metaboliti secondari diversi, cosa in netto contrasto con quanto si sapeva sui microrganismi (ossia che i metaboliti fossero specie-specifici). Per capire quale risultava la vera unità evolutiva si sono usati approcci diversi (morfologiche, genetiche ecc). Una volta capito quale è la vera specie si sono fatti vari

TEST BIOLOGICI/ECOLOGICI: le risposte dei vari ceppi ai trattamenti con i diversi metaboliti sono state valutate esaminando le velocità di divisione cellulare e la tolleranza cellulare. Inoltre tutti i metaboliti secondari isolati sono stati testati usando un campione rappresentativo di ciliati marini interstiziali per verificare le loro attività biologiche.

E. Crassus ==> produce una classe di terpenici, composti che comprendono unità isopreniche lineari o cicliche. Questa morfospecie produce dei sesquiterpeni, composti a 15 atomi di C, in particolare le Euplotine, tra cui la Euplotina C (metabolita più prodotto) che può essere considerato un marcatore chemio-tassonomico per questa specie. Insieme vengono prodotti almeno uno dei suoi 2 analoghi: Euplotina A e/o B, o è accompagnata dal precursore aciclico di tutte e tre chiamato Preuplotina. Abbiamo fatto poi degli studi in vivo sulle Euplotina C, la quale risulta tossica per le specie marine del genere euplotes non produttrici di

euplotine (quindi si utilizza per uccidere le altre specie che competono, attraverso un contatto cellula-cellula). La preuplotina viene prodotta anche da una delle 2 specie filogeneticamente correlate all' E. Crassus, ossia dalla E. minuta. In questa specie la preuplotina rappresenta il marcatore chemio-tassonomico della specie, in quanto è l'unica prodotta.

La più studiata è l'Euplotina C come detto, che a concentrazioni sub-letali è in grado di alterare il ciclo cellulare, la motilità ciliare e la forma cellulare. E' anche stato osservato un effetto inibitorio dell'euplotina C sulla formazione del vacuolo alimentare e sull'endocitosi nella fase fluida in Paramecium primaurelia. E' anche stato osservato un effetto apoptotico dell' euplotina C in linee cellulari tumorali di topo e di ratto.

Ci sono 2 ceppi chiamati PLR e SL che non producono nessuna delle 4 euplotine, ma fanno comunque parte della morfo-specie E. crassus. Questa variazione intra morfospecifica nella produzione di metaboliti secondari, si riflette nella suddivisione che vien fuori dall'analisi morfo-genetica. I 2 ceppi che non le producono sono infatti separate filogeneticamente dagli altri ceppi. Tra loro i vari gruppi non riescono a scambiarsi materiale genetico.

E. Vannus ==> filogeneticamente correlata a E. Crassus. Produce 4 composti e alcuni ceppi indonesiani (Sil21 e BUN3) producono Vannusal A e B (terpenoidi a 30 atomi di C). Gli altri ceppi giappo-francesi (TB6 e CM1) producono normali sesquiterpeni chiamati emivannusal, prevannusal A e B. Nell'ambito dell'analisi morfogenetica torna tutto.

E.focardii ==> comprende ceppi dall'Antartide (TN1) e dalle Galapagos (GBS1, GBS5). Tutti i ceppi producono diterpenoidi, ossia composti a 20 atomi di C e sono l'epossifocardina e il suo precursore chiamato focardina. A differenza dei casi precedenti producono entrambi i metaboliti e si ha una variazione solo quantitativa: i ceppi inter-tropicali producono alte quantità, mentre quello dell'Antartide è un basso produttore di metaboliti.

E.rariseta ==> il composto si chiama rarisetenolide, il suo epossido è l'epossirarisetenolide e poi abbiamo lepirarisetenolide. I ceppi PD16,PBH1 (Nord e Sud Australia), BR1 (Brasile) e GRH5 (Canarie) producono i primi 2, ossia la rarisetonolide e l'epossirarisetenolide, mentre il ceppo NZL2 neozelandese produce l'epirarisetenolide.

E.raikovi ==> il ceppo Mor1 (Marocco) produce il raikovenal e il preraikovenal. I ceppi GA8, SB8, 39W e LPS producono l'epiraikovenal e la secoepiralkovenal.

Conclusioni: I ciliati marini interstiziali appartenenti al genere Euplotes si sono rivelati una ricca sorgente di nuovi terpenici svolgenti varie funzioni. Questi terpenici mostrano attività contro altri ciliati che competono per lo spazio e le risorse nutritive e possiedono anche interessanti proprietà biologiche quali ad esempio un'attività apostolica verso linee cellulari tumorali di topo e ratto. In generale, la natura lipofilica di questi composti indica che i loro principali bersagli sono molto probabilmente le membrane cellulari, dove essi possono svolgere un ruolo molto importante nel controllo chemio-osmotico. Inoltre, i test biologici eseguiti indicano che i terpenici sono probabilmente legati alle membrane esterne dei ciliati in maniera non covalente. L'elevato numero di ceppi geneticamente analizzati per ciascuna morfospecie indica l'esistenza di una variabilità genetica interna che sottostima l'assunzione, generalmente sostenuta, che la morfospecie equivale all'unità evolutiva. Ciò che risulta interessante è che questi gruppi genetici intra-morfospecifici hanno la loro esatta corrispondenza nel risultato ottenuto dall'approccio chemio-tassonomico. Infatti, ceppi differenti appartenenti alla stessa morfospecie ma raggruppati in diversi caldi genetici sono caratterizzati, o a livello qualitativo o a livello quantitativo, da un differente profilo di produzione di metaboliti secondari.

FARMACOLOGIA MARINA

Il 60% dei farmaci oggi sul mercato hanno origine naturale, in particolare vegetale. La farmacologia marina è la scienza che studia nuove molecole con attività terapeutiche derivanti da organismi marini quali piante,

animali superiori e microrganismi. L'80% delle specie animali e vegetali del mondo si trovano a livello del mare.

L'ambiente marino è dotato di grande biodiversità, oltre ad un'alta variabilità chimica, un'alta specificità biochimica e un'alta efficienza di legame. Ciò ha portato a nuovi farmaci, nuovi lead compound e quindi nuovi target. Ad oggi le molecole biologicamente attive derivanti dall'ambiente marino sono circa 27k e 1000 molecole sono scoperte ogni anno: 9 di queste sono diventate farmaci (approvate quindi da EMA e/o FDA), 32 di queste approvate in clinica trials. Di questi 9 approvati per uso clinico 6 sono farmaci antitumorali e uno è un anticorpo farmaco-coniugato.

Le spongosine sono state isolate dalle spugne Tethya crypta verso la fine degli anni '40. Esse hanno un ruolo protettivo nei confronti di patogeni, predatori e parassiti. Sono state isolate la spongouridina e la spongo spongotimidina, simili ma non uguali. Queste danno origine a 4 farmaci ancora in commercio che sono:

- Citarabina —> antitumorale

- Vidarabina —> antivirale ma con problemi di biodisponibilità

- Fludarabina —> antitumorale

- Nelarabina —> antitumorale

Un'altra molecola in commercio è la Ziconotide, sempre approvata come antitumorale, e la Trabectedina, utilizzata contro il tumore al seno. Altro farmaco è il brentuximab vedotin derivato dalla lepre di mare (-MAP: sono anticorpi).

Delle molecole in fase 3 (si valuta l'efficacia del farmaco, i suoi benefici rispetto a farmaci simili già in commercio e il rapporto tra rischi e benefici) troviamo 6 farmaci: 6 analgesici, 5 anittumorali e 2 anticorpi farmaco coniugati ADC (Antibody Drug Conjugates). Esempi sono l'Enfortumab vedotin, il Polatuzumab vedotin e la Tetrodotosossina.

Andando in fase 2 (comincia ad essere indagata l'attività terapeutica del potenziale farmaco e quindi la capacità di produrre sull'organismo umano gli effetti curativi desiderati) troviamo 14 farmaci: 2 indicati per malattie neurologiche, 12 antitumorali e 11 anticorpo farmaco-coniugati ADC.

Nelle molecole in fase 1 (sperimentazione del principio attivo sull'uomo che ha lo scopo di fornire una prima valutazione della sicurezza e tollerabilità del medicinale).